

MIKROSIRU- JA TERÄSPUTKIHÖYRYSTIMIEN VERTAILU
ILMANPAINEFOTOIONISAATIO- MASSASPEKTROMETRIASSA

Jarkko Mäkinen
Helsingin Yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmaseuttisen kemian ja
teknologian osasto

Helmikuu 2014

Tiedekunta Farmasian tiedekunta		Osasto Farmaseuttisen kemian ja teknologian osasto
Tekijä Jarkko Kristian Mäkinen		
Työn nimi Mikrosiru- ja teräspuutkihöyrystimien vertailu ilmanpaine-fotoionisaatio-massaspektrometriassa		
Oppiaine Farmaseuttinen kemia		
Työn laji Pro Gradu -tutkielma	Aika Helmikuu 2014	Sivumäärä 46
<p>Analyyttisten laitteistojen miniatyrisointi massaspektrometriassa on laajan mielenkiinnon kohteena tutkijoiden keskuudessa. Miniatyrisoinnin etuina perinteisiin menetelmiin verrattuna ovat analyysiaikojen lyheneminen, liuottimien ja näytteiden pienempi kulutus, laajamittaisen automatisoinnin mahdollisuudet sekä pienemmät taloudelliset kustannukset. Viime aikoina on kehitetty lasinen kuumennettu mikrosiru- ja uudempi teräspuutkihöyrystin. Tutkielmassa verrattiin keskenään höyrystimien suorituskykyä fotoionisaatio ilmanpaineessa-massaspektrometriassa.</p> <p>Tarkastelun kohteena olivat ajo-olosuhteiden muutosten sekä eri dopanttien vaikutukset analyyttien signaalin intensiteettiin. Ajo-olosuhteiden muutosten parametreinä käytettiin sumutinkaasun ja näytteen virtausnopeutta sekä höyrystimen lämmitystehoa. Lisäksi mitattiin höyrystimien ulosvirtauskaasun lämpötilaa eri sumutinkaasun virtausnopeuksilla.</p> <p>Analyyttien signaalien intensiteettiprofiilit olivat erilaiset höyrystimien välillä sumutinkaasun virtausnopeuden ja höyrystimen lämmitystehon osalta. Näytteen virtausnopeuden muutoksiin höyrystimet puolestaan reagoivat samalla tavalla. Mitä nopeampi näytteen virtausnopeus oli, sitä voimakkaampi signaalin intensiteetti. Teräspuutkihöyrystin tuotti keskimäärin voimakkaammat signaalit analyyteistä kuin lasinen mikrosiru. Lasisirun lämpötila oli huomattavasti korkeampi ulosvirtauskaasun lämpötilan mittauksissa kuin teräspuutkella. Tolueenilla saatiin analyyteistä voimakkaimmat signaalit dopanttien vertailussa.</p> <p>Teräspuutki oli tehokkaampi analyyttien ionisoimisessa kuin lasisiru. Teräspuutkella voi tosin olla hankalaa analysoida korkean kiehumispisteen omaavia yhdisteitä. Teräspuutki oli tarkoitus yhdistää tässä erikoistyyssä capLC:hen, mutta laitteistojen teknisten ongelmien vuoksi tässä ei onnistuttu. Tulevaisuudessa teräspuutken lämmitysmekanismia tulisi kehittää, jotta sillä voitaisiin analysoida myös korkean kiehumispisteen yhdisteitä. Lisäksi sitä voisi tutkia myös muiden ionisaatiotekniikoiden kanssa, aivan kuten lasisirunkin kanssa on tehty.</p>		
Avainsanat Mikrosiruhöyrystin, teräspuutkihöyrystin, massaspektrometria, miniatyrisointi, fotoionisaatio ilmanpaineessa		
Säilytyspaikka Farmaseuttisen kemian ja teknologian osasto		
Muita tietoja Ohjaajat: Tiina Kauppila, FT, Helsingin yliopisto Riikka Räsänen, FM, tohtorikoulutettava, Helsingin yliopisto Markus Haapala, FT, Helsingin yliopisto		

Faculty Faculty of Pharmacy		Department Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology	
Author Jarkko Kristian Mäkinen			
Title Comparison of microchip nebulizer and steel tube nebulizer in atmospheric photoionization-mass spectrometry.			
Subject Pharmaceutical Chemistry			
Level Master's Thesis	Month and year February 2014	Number of pages 46	
<p>Abstract</p> <p>Miniaturizing of analytical techniques in mass spectrometry has received a lot of attention amongst scientists. The gains of miniaturization of analytical systems are rapid analyses, lower solvent consumption, the option for automatization and lower costs. A glass-made microchip heated nebulizer and a newer version, steel-made nebulizer, have been recently developed. The aim of this study was to evaluate and compare performances of the nebulizers.</p> <p>Changes in test conditions and effects of different dopants to intensiveness of the analytes' signals were analyzed. Speed of nebulizer gas, speed of analyte flow and magnitude of heating were the parameters of the changes in test conditions. The temperature of the flow from the nebulizers was also measured and analyzed.</p> <p>The intensiveness profiles of the analytes between the nebulizers were unequal, when changes in the speed of nebulizer gas and magnitude of heating were measured. The nebulizers reacted the same way to changes of the speed of analyte flow. The faster the analyte flow was, the more intensive the analytes' signals were. The steel tube nebulizer generated on average more intensive signals of the analytes than glass-made microchip. Temperature of the glass-made nebulizer was considerably higher than that of steel tube nebulizer. The most intensive signals of the analytes were achieved when toluene was used as a dopant.</p> <p>Steel tube nebulizer was more efficient in ionizing analytes than glass-made microchip. However, with steel tube nebulizer it could be difficult to analyze compounds with high boiling point. One goal of this study was to combine the steel tube nebulizer with capLC, but due to technical failures of the capLC equipment this was not possible. In the future, it would be beneficial to improve the steel tube nebulizer's heating mechanism. Also it could be combined with other ionization techniques as has been done with glass-made nebulizer.</p>			
Keywords Microchip nebulizer, steel tube nebulizer, mass spectrometry, miniaturization, atmospheric photoionization			
Where deposited Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology			
Additional information Supervisors: Tiina Kauppila, PhD, University of Helsinki Riikka Räsänen, M.Sc., Doctoral student, University of Helsinki Markus Haapala, PhD, University of Helsinki			

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	1
2	KIRJALLISUUSKATSAUS	2
2.1	Ilmanpaineessa toimiva fotoionisaatio	2
2.2	Mikrosiruhöyrystimellä ja μ APPI:lla tehtyjä tutkimuksia	7
2.3	Erikoistytön tutkimustavoitteet	12
3	KOKEELLINEN OSA	13
3.1	Analyytit ja reagenssit	13
3.2	Laitteisto	14
3.3	Näytteiden valmistus	16
4	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	17
4.1	Ajo-olosuhteiden vaikutus signaalin intensiteettiin	17
4.1.1	Sumutinkaasun virtausnopeuden vaikutus	17
4.1.2	Näytteen virtausnopeuden vaikutus	19
4.1.3	Lämmitystehon vaikutus	22
4.2	Höyrystimien lämpötilan mittaaminen	26
4.3	Dopanttien vaikutus signaalien intensiteettiin	28
4.3.1	Metanoli-vesi	28
4.3.2	Asetonitriili-vesi	33
4.4	Kapillaarinestekromatografia	40
5	JOHTOPÄÄTÖKSET	40
	KIRJALLISUUSLUETTELO	42

LYHENTEIDEN SELITYKSET

AAS	anaboliset androgeeniset steroidit
AP	ilmanpaine
APCI	kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa
API	Ionisaatio ilmanpaineessa
AP-MALDI	ilmanpaineessa toimiva matriisiavusteinen laser-desorptioionisaatio
APPI	fotoionisaatio ilmanpaineessa
APTSI	ilmanpaineessa toimiva thermospray-ionisaatio
capLC	kapillaarinestekromatografia
CE	kapillaarielektroforeesi
DAPPI	desorptio-fotoionisaatio ilmanpaineessa
DESI	desorptio-sähkösumutusionisaatio
EI	elektroni-ionisaatio
ESI	sähkösumutusionisaatio
GC	kaasukromatografi
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia
HTS	high-throughput screening
IE	ionisaatioenergia
IS	kaasuvirtausavusteinen sähkösumutus, ion spray
LC	nestekromatografia
MS	massaspektrometria
μAPCI	mikrosiru-kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa
μAPPI	mikrosiru-fotoionisaatio ilmanpaineessa
μESI	mikrosiru-sähkösumutusionisaatio
μ-TAS	micro-total analysis system
PA	protoniaffiniteetti
PAH	polyaromaattiset hiilivedyt
RP-LC	käänteisfaasinestekromatografia
SARM	selektiiviset androgeenireseptorin modulaattorit
SSI	sonic spray ionisaatio
TIC	kokonaisionivirta
TSI	thermospray-ionisaatio
WADA	Maailman antidopingtoimisto

1 JOHDANTO

Analyyttisten instrumenttien miniatyrisointi massaspektrometriassa (MS) on herättänyt laajaa mielenkiintoa tutkijoiden keskuudessa jo usean viime vuosikymmenen ajan. Miniatyrisoinnin huomattavina etuina perinteisiin menetelmiin verrattuna ovat esimerkiksi nopeammat analyysit, liuottimien ja näytteiden pienempi kulutus sekä laajamittaisen automatisoinnin mahdollisuudet. Tämän seurauksena myös taloudelliset kustannukset ovat huomattavasti pienemmät käytettäessä miniatyrisoituja laitteistoja.

Massaspektrometriassa useita miniatyrisoituja laitteistoja on kehitetty ns. micro-total analysis system (μ -TAS), tai ”Lab-on-a-chip”, – konseptin esittelemisen jälkeen (Manz ym. 1990). Konseptin ideana on saada kaikki tutkimusmenetelmän eri vaiheet (näytteen esikäsittely, yhdisteiden erotus, ionisointi, detektio ym.) yhdelle mikrosirulle. Massaspektrometriaan liittyvät miniatyrisoidut laitteet on yleensä valmistettu piistä, lasista, kvartsista tai polymeerista. Instrumenttien koko vaihtelee joistakin millimetreistä senttimetreihin, ja instrumenttien sisäisten rakenteiden koko on mikrometriluokkaa. Miniatyrisointia on hyödynnetty massaspektrometriassa laajalla rintamalla tutkimusmenetelmien kehityksessä. Farmaseutisessa ja bioanalyttisessä tutkimuksessa sitä on hyödynnetty mm. proteomiikassa, genomiikassa, kliinisessä diagnostiikassa ja lääkekehityksessä (Auroux ym. 2002; Huikko ym. 2003; Khandurina ja Guttman 2002).

Ensimmäinen analyttinen mikrosiru oli piistä valmistettu kaasukromatografi (GC) (Terry ym. 1979). Siinä näytteet injisoitiin venttiilin kautta kanavaan, jossa oli kaasuvirtaus. Yhdisteiden erottuminen tapahtui kapillaarissa, ja detektointi tapahtui piilevyyn integroidun kaasujen lämmönjohtavuutta mittaavan detektorin avulla. Tämä kaikki tapahtui samalla piilevyllä, joten systeemiä voitaneen pitää jonkinasteisena esinä μ -TAS-maailmassa.

Myös kapillaarielektroforeesissa (CE) on hyödynnetty miniatyrisointia. Ensimmäiset mallit esitettiin 1990-luvun alussa (Harrison ym. 1992; Manz ym. 1992). Perinteiseen CE:hen verrattuna miniatyrisoiduilla systeemeillä on saavutettu huomattavasti nopeampia analyysiajoja (Huikko ym. 2003). Näytteen yhdisteiden erottaminen

mikrosysteemeissä tapahtuu helpoiten CE:llä, koska virtausnopeudet ovat sopivan pieniä mikroskaalaan (Manz ym. 1992).

Nestekromatografia (LC) mikrosirulla esitettiin ideana ensimmäisen kerran vuonna 1990 (Manz ym. 1990). LC on tekniikkana ollut hankalampi toteuttaa mikroskaalassa kuin CE (Huikko ym. 2003). Nykyään kuitenkin on jo olemassa erilaisia HPLC-Chip/MS – laitteistoja, joita on myös kaupallisesti saatavissa, esimerkiksi vuonna 2005 esitelty Agilentin laitteisto (Yin ym. 2005).

Ilmanpaineessa tapahtuvien ionisaatiomenetelmien (API-ionisaatiomenetelmät) miniaturisoinnissa sähkösumutusionisaatio (ESI) on ollut ylivoimaisesti suurimman mielenkiinnon kohteena (Sikanen ym. 2009). Myös kemiallista ionisaatiota ilmanpaineessa (APCI) on miniaturisoitu. Ensimmäinen μ APCI-siru esiteltiin vuonna 2004 (Östman ym. 2004). Se oli rakennettu lasi- ja piilevyistä, jotka kiinnitettiin toisiinsa. Tässä erikoistyyssä ionisaatiomenetelmänä käytetystä fotoionisaatiosta ilmanpaineessa (APPI) esitettiin miniaturisoitu versio ensimmäisen kerran niin ikään vuonna 2004 (Kauppila ym. 2004b). APPI:n etu muihin API-ionisaatiomenetelmiin verrattuna on sen kyky ionisoida polaaristen lisäksi myös poolittomia yhdisteitä (Cai ym. 2005; Kauppila ym. 2004b).

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

Kirjallisuuskatsauksessa käydään läpi APPI:n ionisaatiomekanismi ja APPI:n kanssa yleisesti käytettyjä dopanteja ja niiden ominaisuuksia. Tämän jälkeen siirrytään miniaturisoiuihin μ APPI-laitteistoihin ja tarkastellaan millaisia tutkimuksia niillä on tehty.

2.1 Ilmanpaineessa toimiva fotoionisaatio

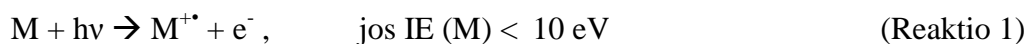
Ensimmäiset viitteet fotoionisaation käytöstä analyyttien ionisaatiossa ja detektoinnissa ovat peräisin 1970- ja 1980-luvuilta, jolloin fotoionisaatiota käytettiin vakuuissa (Driscoll ja Clarici 1976; Driscoll ja Spaziani 1976; Langhorst 1981). Tuolloin

fotoionisaatiota käytettiin yhdessä GC:n kanssa. Massaspektrometriin APPI yhdistettiin ensimmäistä kertaa vuonna 1986 (Revel'skii ym. 1986). Revel'skii työryhmineen käyttivät höyrystimessään fotoionisaatiolamppua ^{63}Ni -lähteen sijasta. Menetelmällä pystyttiin analysoimaan entistä laajempi valikoima yhdisteitä, ja lisäksi analyyttien detektioraja alentui huomattavasti aiempaan verrattuna.

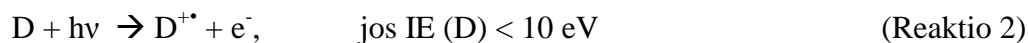
Ensimmäiset APPI-tekniikkaa hyödyntävät LC-MS-laitteistot esiteltiin vuonna 2000 (Robb ym. 2000; Syage ym. 2000). APPI liitettiin LC-MS:aan ionisoimaan sellaisia neutraaleja poolittomia yhdisteitä, joita muilla API-tekniikoilla ei pystytty ionisoimaan (Robb ym. 2000).

Ionisaation aikaansaamiseksi APPI:ssa käytetään kryptonvarauslamppua, joka emittoi 10 eV:n fotoneita (Robb ym. 2000). Nämä fotonit voivat ionisoida näytemolekyyliä, joiden ionisaatioenergia (IE) on pienempi kuin 10 eV joko suoraan tai erillisen apuaineen, dopantin, välityksellä. APPI ei ionisoi yleisesti käytössä olevia liuottimia ja apukaasuja, koska niiden IE:t ovat yleensä yli 10 eV (Kauppila 2004). Tästä johtuen APPI:lla voidaan ionisoida analyyttejä selektiivisesti ilman suurta taustaionisaatiota.

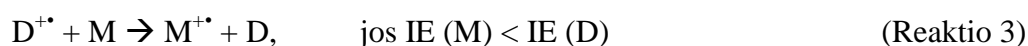
APPI:ssa näyte saatetaan kaasufaasiin sumutinkaasun ja lämmön avulla ja muodostunut kaasu ohjataan ionisaatiokammioon. Ionisaatiokammiossa näytteiden ionisaatio tapahtuu joko suoraan tai dopantin välityksellä. Suorassa ionisaatiossa (Reaktio 1) fotoni (hv) irrottaa näytemolekyylistä (M) elektronin (e^-) (Syage 2000; Syage ym. 2000).



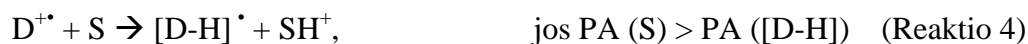
Epäsuorassa ionisaatiossa näytemolekyyli ionisoituu dopantin (D) välityksellä joko varauksenvaihdolla tai protoninsiirroilla eluentin (S) kautta (Kauppila ym. 2002). Aluksi dopantti ionisoituu fotonin vaikutuksesta, jos dopantin IE on pienempi kuin 10 eV (Reaktio 2).



Dopanttiradikaali voi tämän jälkeen ionisoida näytemolekyylin (Reaktio 3), jos näytemolekyylin IE on pienempi kuin dopantin IE (Kauppila ym. 2002). Varauksenvaihtoreaktiossa muodostuu radikaalikationi.



Reaktiossa 2 muodostunut dopantti-ioni voi myös reagoida ensin eluenttimolekyylin kanssa (Reaktio 4) (Kauppila ym. 2002). Eluentilla on oltava suurempi protoniaffiniteetti (PA) kuin dopantilla, jotta reaktio voisi tapahtua (Reaktio 5).



Muodostunut protonoitunut eluenttimolekyyli voi reagoida näytemolekyylin kanssa (Reaktio 6), jos näytemolekyylin PA on suurempi kuin eluentin (Kauppila ym. 2002). Tuloksena on tällöin protonoitunut eluenttimolekyyli toisin kuin varauksen siirrossa muodostunut radikaalikationi (Reaktio 3).



Dopanttiradikaalikationien elinikä on pidempi kuin fotonien, joten dopantin avulla saadaan enemmän tehollisia analyyttien ionisoitumisreaktioita, jolloin näytteiden ionisoitumisen intensiteetti kasvaa (Kauppila ym. 2002). Dopantin käyttö ionisaatiotehokkuuden lisääjänä esitettiin ensimmäisen kerran vuonna 1991, kun bentseeniä käytettiin lisäämään APCI:n herkkyyttä yhdisteille, joilla on alhainen PA (Ketkar ym. 1991).

Perinteisin dopanttina käytetty aine on edelleen yleisesti käytössä oleva tolueeni (Robb ym. 2000). Muita yleisesti käytössä olevia dopantteja ovat asetoni (Robb ym. 2000), anisoli (Kauppila ym. 2004a) ja klooribentseeni (Smith ym. 2009). Vähemmän käytettyjä dopantteja on esimerkiksi bentseeni (Tubaro ym. 2003) sekä erilaiset dopanttien yhdistelmät. Tässä erikoistyössä dopanteina käytettiin tolueenia, anisolia 0,5 % tolueenissa, asetonia sekä klooribentseeniä.

Tolueeni voi reagoida muiden yhdisteiden kanssa joko protoninsiirtoreaktiolla tai varauksen vaihdolla (Mol 2005; Mol ym. 2005). Se pystyy reagoimaan suhteellisen tehokkaasti sekä poolisten että poolittomien yhdisteiden kanssa. Tolueeni voi luovuttaa protonin analyytille, jos analyytin PA on suurempi kuin deprotonoituneen tolueeniradikaalin eli bentsyyliiradikaalin PA. Tässä erikoistyössä käytettyjen metanolin ja asetonitriilin kanssa tolueeni reagoi protoninsiirtoreaktiolla, vaikka metanolin ja asetonitriilin PA:t (Taulukko 1) ovat pienempiä kuin tolueenin (Taulukko 2).

Asetoni ionisoi parhaiten polaarisia yhdisteitä, joiden kanssa se voi reagoida protoninsiirtoreaktiolla (Mol 2005; Mol ym. 2005). Asetonilla on korkea PA, joten se protonoituu helposti. Protonoituneena se ei pysty reagoimaan käytännössä ollenkaan analyyttien kanssa varauksenvaihdolla. Asetoni ionisoi tehokkaimmin sellaisia yhdisteitä, joilla on korkea PA (Robb ym. 2000).

Anisolilla on myös korkea PA asetonin tapaan, mutta asetoniin verrattuna pienempi IE (Taulukko 2). Anisoli pystyy ionisoimaan varauksen vaihdolla tehokkaasti yhdisteitä, joilla on sekä pieni IE että PA, toisin kuin esimerkiksi tolueeni (Kauppila ym. 2004a). Anisoli yksinään ei pysty tehokkaasti ionisoimaan yhdisteitä, joilla on korkea IE, tai jos

anisolin ja analysoitavan yhdisteen IE:n ero on pieni (Smith ym. 2009). Anisolin ja tolueenin yhdistelmä pystyy ionisoimaan myös korkean IE:n yhdisteitä, mutta jos analysoitavan yhdisteen IE on lähellä anisolin IE:tä, ionisaatio ei todennäköisesti ole tehokasta, riippumatta anisolin pitoisuudesta tolueenissa. Anisolin varauksenvaihdossa näytteeltä siirtyy elektroni anisolille (Kauppila ym. 2004a). Analyytit, joilla on alhainen PA, ionisoituvat anisolin kanssa myös käytettäessä käänteisfaasi-nestekromatografiaa (RP-LC) korkean PA:n liuottimilla, esimerkiksi ammoniakilla (853,6 kJ/mol, (NIST Webbook 2011a) ja metyyli-*tert*-butyylieetterillä (841,6 kJ/mol, (NIST Webbook 2011a).

Klooribentseeni on uudempi dopantti (Smith ym. 2009). Sillä on suhteellisen korkea IE (Taulukko 2), joten se pystyy ionisoimaan varauksenvaihdolla myös korkean IE:n omaavia yhdisteitä. Suurin herkkyys sillä on kuitenkin matalan ja kohtalaisen IE:n yhdisteille.

Taulukko 1: Liuottimien fysikaalisia ominaisuuksia, M = molekyylimassa (NIST Webbook 2011b).

	Metanoli	Asetonitrili	Vesi
M (g/mol)	32,0	41,1	18,0
IE (eV)	10.84 ± 0.01	12.20 ± 0.01	12.621 ± 0.002
PA (kJ/mol)	754,3	779.2	691.0

Taulukko 2: Dopanttien fysikaalisia ominaisuuksia (NIST Webbook 2011b).

	Tolueeni	Asetoni	Klooribentseeni	Anisoli
(g/mol)	92,1	58,1	112,6	108,1
IE (eV)	8,828 ± 0,001	9,703 ± 0,006	9,07 ± 0,02	8,20 ± 0,05
PA (kJ/mol)	784,0	812,0	753,1	839,6

2.2 Mikrosiruhöyrystimellä ja μ APPI:lla tehtyjä tutkimuksia

Miniatyrisoidut versiot APPI:sta ovat jo osoittaneet monia etuja perinteiseen APPI:iin verrattuna (Ahonen ym. 2010; Haapala ym. 2007a; Haapala ym. 2010; Hintikka ym. 2013; Kauppila ym. 2004b; Kruve ym. 2011; Luosujärvi ym. 2008; Luosujärvi ym. 2010). Miniatyrisoidussa APPI:ssa käytetään apuna mikrosiruhöyrystintä, johon on integroitu kanavat näytekapillaarille ja apukaasulle, jotka liittyvät yhteen ja muodostavat suuttimelle jatkuvan yhteisen höyrystyskanavan. μ APPI kuluttaa vähemmän liuottimia ja näytteitä, sitä voidaan lämmitellä nopeasti ja siihen ei tarvitse johtaa suuria jännitteitä. Lisäksi sirun valmistuskustannukset ovat alhaiset.

Mikrosiruhöyrystimen ensimmäinen versio esiteltiin vuonna 2004 (Kauppila ym. 2004b). Tuolloin höyrystin ei ollut vielä kokonaan lasista rakennettu, vaan siinä oli yhdistetty pii- ja lasilevyt toisiinsa. Tutkimuksessa havaittiin, että paras signaalin intensiteetti saavutettiin kryptonvarauslampun ollessa mahdollisimman lähellä massaspektrometrin suuta. Mikrosiruhöyrystimen tuli olla aivan lampun vieressä. Kauppilan ym. (2004b) tutkimuksessa verrattiin perinteistä APPI:a μ APPI:iin neljällä eri yhdisteellä: akridiinia ja 2-naftolia käytettiin positiivisessa ionimoodissa ja 1,4-naftokinonia sekä naftaleenihappoa negatiivisessa ionimoodissa. μ APPI tuotti samat ionit keskimäärin yhtä vahvalla intensiteetillä kuin perinteinen APPI, ja ionisaatiomekanismi oli molemmissa menetelmissä samanlainen. μ APPI:n eduksi laskettiin mahdollisuus yhdistää laite mikro-/nano-LC:hen, mikä puolestaan ei onnistunut perinteiseltä APPI:lta.

Kauppilan ym. 2004 käyttämää lasi-pii-mikrosirua testattiin myös μ APCI:n kanssa (Östman ym. 2004). Tutkimuksessa analysoidut yhdisteet olivat polaarisuudeltaan hyvin erilaisia, ja mikrosiru pystyi ionisoimaan yhdisteitä, riippumatta niiden polarisuudesta, hyvin tehokkaasti herkkyuden ollessa jopa alle 1 fmol/s. Tutkijat pitivät menetelmää mielenkiintoisena vaihtoehtona miniatyrisoidulle ESI:lle.

Lasi-pii-mikrosirua kehitettiin edelleen, ja vuonna 2006 sirua testattiin jälleen μ APCI:n kanssa (Franssila ym. 2006). Se kesti korkeampia lämpötiloja Kauppilan ym. 2004

esittelemään malliin verrattuna. Tämä oli hyödyllistä etenkin analysoitaessa yhdisteitä, joilla on korkea kiehumispiste. Sirua pystyttiin käyttämään joitakin viikkoja ilman havaittavaa suorituskyvyn heikkenemistä.

Lasi-pii-mikrosirusta kehitettiin kokonaan lasista tehty versio (Saarela ym. 2007). Uudemmassa mikrosirussa pystyttiin käyttämään korkeampaa lämpötilaa kuin aiemmassa versiossa, koska uuden lasisirun liitoskohdat altistuivat aikaisempaan lasi-pii-siruun verrattuna alhaisemmille lämpötiloille. Aikaisempien lasi-pii-sirujen ongelmana oli nimenomaan ollut liitoskohtien pettäminen liian korkean lämpötilan vuoksi. Uudempi lasinen mikrosiru kesti jatkuvia analyysiajoja muutamista päivistä joihinkin viikkoihin riippuen käytetystä lämpötilasta.

Vuonna 2007 μ APPI yhdistettiin kapillaarinestekromatografiaan (capLC) sekä GC:hen (Haapala ym. 2007a). Haapala työryhmineen tutki Franssilan ym. vuonna 2006 esittelemää vanhempaa lasi-pii-mikrosirua GC:n ja uudempaa lasista mikrosirua capLC:n kanssa. Analyytteinä käytettiin polyaromaattisia hiilivetyjä (PAH) asenafteneja, antraseenia ja bentsoapyreenia GC:n kanssa sekä testosteronia ja progesteronia capLC:n kanssa. Mikrosirua pystyttiin käyttämään onnistuneesti sekä GC:n että capLC:n kanssa suorituskyvyn ollessa samaa tasoa kuin perinteisillä menetelmillä, ja se sopii sekä kvalitatiiviseen että kvantitatiiviseen analyysiin. Lisäksi μ APPI on helppo muuttaa μ APCI:ksi vaihtamalla kryptonvarauslamppu koronapurkausneulaan. Tutkimuksessa pohdittiin myös sitä, olisiko mahdollista valmistaa samaan siruun myös erotusmenetelmä esim. CE:a hyväksikäyttäen. Positiivisena puolena pidettiin myös sitä, että mikrosiru voidaan yhdistää mihin tahansa massaspektrometriin, joka sisältää AP-ionilähteen.

Luosujärvi ym. käyttivät μ APPI:a polykloorattujen bifenyyliden (PCB-yhdisteet) analyysiin maaperänäytteistä (Luosujärvi ym. 2008). Tutkimuksessa käytettiin Franssilan ym. 2006 tyyppistä lasi-pii-mikrosirua. Erotusmenetelmänä käytettiin GC:tä, ja massaspektrometriä käytettiin tällä kertaa negatiivisessa ionimoodissa (Luosujärvi ym. 2008). μ APPI:n suorituskikyä verrattiin μ APCI:iin. PCB-yhdisteiden toteamisraja oli μ APPI:lla hieman korkeampi verrattuna μ APCI:iin. Yhdeksi syyksi tutkijat pohtivat

μ APPI:n kryptonvarauslampun suhteellisen suurta kokoa, joka häytti mikrosirun asettamista optimaaliselle etäisyydelle massaspektrometrissä. APCI:n koronapurkausneula on kooltaan huomattavasti pienempi, joten sirun optimaalisen paikan löytäminen sujuu huomattavasti helpommin. Maaperänäytteiden osalta GC/ μ APPI-MS-systeemi osoittautui luotettavaksi menetelmäksi niiden analysointiin. μ APPI oli toistettavampi ionisaatiomenetelmä kuin μ APCI.

μ APPI:a käytettiin myös raakaöljyn analysointiin vuonna 2009 (Haapala ym. 2009). μ APPI oli huomattavasti parempi verrattuna perinteiseen APPI:iin siinä mielessä, että pienempien virtausnopeuksien johdosta massaspektrometrille pääsi huomattavasti vähemmän analysoitavaa ainetta, mikä puolestaan esti massaspektrometrin ionilähdettä likaantumasta. μ APPI:n optimaalinen virtausnopeus tässä tutkimuksessa oli 2 μ L/min, kun perinteisellä menetelmällä se on 50 μ L/min luokkaa. Lisäksi mikrosiru oli helposti vaihdettavissa toiseen, millä pystyttiin varmistamaan se, ettei seuraavaan ajoon päässyt edellisen ajon analyytijäämiä häiritsemään mittauksia. Sirua myös pystyi puhdistamaan analyytijäämistä ajamalla puhdasta tolueenia sirun läpi. μ APPI ei ollut yhtä herkkä verrattuna perinteiseen menetelmään, mutta ero ei ollut tutkijoiden mukaan merkitsevä.

Vuonna 2010 Haapala ym. testasivat lasisirua, johon oli integroitu LC-kolonne, kanava optista detektiota varten sekä kuumennettava höyrystin (Haapala ym. 2010). Analysoitavina yhdisteinä oli PAH-yhdisteitä sekä selektiivisiä androgeenireseptorin modulaattoreita (SARM-yhdisteet). Siru oli siinä mielessä mielenkiintoinen, että detektio pystyttiin tekemään sekä optisesti että μ APPI-massaspektrometrialla. Optista detektiota käytettiin fluoresoivien yhdisteiden kanssa. Siru oli yhteensopiva minkä tahansa API-massaspektrometrin kanssa, ja automatisoitavissa perinteisen LC:n tapaan.

Lasisella mikrosirulla on myös pystytty analysoimaan anabolisia androgeenisia steroideja (AAS-yhdisteitä) virtsanäytteistä (Ahonen ym. 2010). Tutkimuksessa käytettiin yhdisteiden erottamiseen capLC:a. Nollavirtsan lisättiin anabolisia steroideja 50 ng/ml – pitoisuuteen. Mikrosirua hyödyntävä laitteisto kykeni havaitsemaan yhdisteet luotettavasti ja toistettavasti. Näin ollen sillä oli potentiaalia esimerkiksi

urheilussa käytettyjen kiellettyjen dopingaineiden analyysissä sekä muissa bioanalyysissä.

Vastaavalla tavalla AAS-yhdisteitä analysoitiin pii-lasisirulla myös GC:aa käyttäen (Hintikka ym. 2010). Myös GC:n kanssa siru toimi hyvin, osoittaen lupaavia tuloksia bionäytteiden analyysissä. Analyysimenetelmän detektiorajat olivat 0,2-1 ng/ml yhdisteestä riippuen, ja menetelmän toistettavuus ja lineaarisuus olivat hyvää luokkaa. Ahosen ym. 2010 tutkimuksesta poiketen tässä tutkimuksessa käytettiin kahta metandienoniannoksen jälkeen otettua virtsanäytettä. Mikrosirulla tehtyä analyysiä verrattiin perinteiseen kaasukromatografia-elektroni-ionisaatio-massaspektrometria-menetelmään (GC-EI-MS), ja tulokset olivat hyvin yhteneväisiä. Hintikka ym. pitivät erityisesti μ APPI:n pehmeää ionisaatiota sen vahvuutena, koska se tuotti suuren määrän protonoitunutta näytemolekyyliä hajottamatta sitä pilkeioniksi liikaa. Tämän vuoksi menetelmä oli hyvin selektiivinen ja herkkä.

Haapalan (2010) ym. vuonna tutkimia SARM-yhdisteitä tutkittiin pii-lasisirulla myös GC:n kanssa (Luosujärvi ym. 2010). SARM-yhdisteitä lisättiin puhtaisiin virtsanäytteisiin samalla tavalla kuin Ahosen ym. 2010 tekemässä tutkimuksessa. Analyyttien pitoisuudet olivat 10 pg/ml – 100 ng/ml luokkaa. Detektiorajaksi saatiin 0,01 – 1 ng/ml ja kvantitointirajaksi 0,03 – 3 ng/ml, joten kyseisellä menetelmällä voidaan analysoida kohtuullisen pieniä pitoisuuksia. Tutkimuksessa saadut detektio- ja kvantitointirajat alittivat Maailman antidopingtoimiston (WADA) asettamat rajat luotettavalle doping-testaukselle. Näin ollen mikrosirulla on potentiaalia toimia dopingaineiden analyysissä sekä yhdistettynä GC:aan (Luosujärvi ym. 2010) että capLC:aan (Ahonen ym. 2010).

Mikrosiruhöyrystimellä tutkittiin vuonna 2011 torjunta-aineiden jäämiä tomaateista (Kruve ym. 2011). Analyyyteinä käytettiin oksamyylä, metomyylä, aldikarbia, karbofuraania, pirimikarbia, tiokarbia ja ditalimfoja. Tomaatinäytteiden esikäsittelyn jälkeen niihin lisättiin torjunta-aineliuosta ja syntynyt seos analysoitiin capLC- μ APPI-MS/MS- menetelmällä. Detektiorajaksi saatiin 0,25 ng/ml, joka alitti selvästi torjunta-

aineiden sallitun määrän kaikilla yhdisteillä. Menetelmää pystytettäisiin käyttämään siis elintarvikkeiden torjunta-ainejäämien analysointiin hyvinkin tehokkaasti.

Vuonna 2013 anabolisia steroideja analysoitiin uudestaan vastaavalla menetelmällä kuin Hintikan ym. vuonna 2010 tekemässä tutkimuksessa GC:n kanssa (Hintikka ym. 2013). Tällä kertaa dopanttina käytettiin klooribentseeniä, jota tutkitaan myös tämän erikoistyon dopanttivertailussa. Lisäksi GC- μ APPI-MS/MS- menetelmää verrattiin perinteiseen GC-EI-MS- menetelmään. Analyysitehokkuudeltaan mikrosirulla kehitetty menetelmällä saatiin yhteneväisiä tuloksia verrattuna perinteiseen menetelmään. Detektorajaksi GC- μ APPI-MS/MS- menetelmälle saatiin 0,05 – 0,5 ng/ml riippuen analysoitavasta yhdisteestä, mikä oli linjassa aikaisemmissa tutkimuksissa saatuihin detektorajoihin.

Sähkösumutusionisaatio on ollut kaikista API-ionisaatiotekniikoiden miniatyrisoinnista ylivoimaisesti suurimman mielenkiinnon kohteena. ESI:n historia ulottuu jopa vuoteen 1914, jolloin kuvattiin ensimmäistä kertaa ESI:n ionisaatiomekanismi, jossa ohueen kapillaariin, josta näyte tulee ulos, liitetään korkeajännite (Zeleny 1914). Tällöin ulos virtaava näyteliuos hajoaa yhä pienemmiksi pisaroiksi. Massaspektrometriaan ESI yhdistettiin ensimmäisen kerran vuonna 1984 (Yamashita ja Fenn 1984). Nanosprayn kehittäminen oli ensimmäinen askel ESI:n miniatyrisoinnissa (Wilm ja Mann 1996; Wilm ja Mann 1994). Ensimmäiset mikrosirua hyödyntävät μ ESI-laitteistot rakennettiin vuonna 1997 (Ramsey ja Ramsey 1997; Xue ym. 1997). Vuonna 2010 mikrosirua käytettiin kaasuvirtausavusteisen sähkösumutuksen kanssa (ion spray, IS) (Pól ym. 2010). Tutkimuksessa todettiin mikrosirun pystyvät ionisoimaan sekä pieniä molekyylejä että isompia biomolekyylejä, kun ionisaatiomenetelmänä käytettiin IS:ää. Mikrosirua testattiin tutkimuksessa peptidien analysoimisessa menestyksekkäästi myös capLC:n kanssa.

Fotoionisaatio ilmanpaineessa ei ole ainoa ilmanpaineessa toimiva ionisaatiotekniikka, jossa on käytetty hyväksi mikrosiruhöyrystintä. Sonic spray – ionisaatio (SSI) esitettiin ensimmäisen kerran vuonna 1994, ja miniatyrisoitu versio kehitettiin vuonna 2007 (Hirabayashi ja Sakairi 1994; Pól ym. 2007). Pól (2007) työryhmineen käyttivät

Franssilan (2006) ym. kehittämää versiota pii-lasi mikrosirusta SSI:n kanssa analysoidessaan lääkaineita ja hormoneja. Sirun avulla pystyttiin luomaan menetelmä, joka oli hyvin toistettava ja stabiili sekä positiivisessa että negatiivisessa ionimoodissa.

Thermospray-ionisaatio (TSI, ilmanpaineessa APTSI) oli yksi ensimmäisistä kaupallistuneista ionisaatiotekniikoista, jota käytettiin LC-MS-laitteistoissa (Blakley ym. 1980; Blakley ja Vestal 1983). TSI oli tärkeä tekijä koko LC-MS-tekniikan yleistymisestä analyttisessä kemiassa. TSI:n apuna käytettiin mikrosiruhöyrystintä ensimmäistä kertaa vuonna 2009 (Keski-Rätkönen ym. 2009). Keski-Rätkönen ym. analysoivat poolisia ja poolittomia yhdisteitä, ja vertasivat saamiaan spektrejä μ APCI:lla ja ESI:llä saatuihin spektreihin samoista yhdisteistä. μ APTSI muodosti hyvin samankaltaisia spektrejä kuin ESI, mutta μ APTSI sietä ESI:a paremmin ajoliuokseen lisättyjä additiiveja. Keski-Rätkönen ym. totesivat, että μ APTSI oli hyvin pehmeä ionisaatiotekniikka, jota pystyisi hyödyntämään esim. biomolekulaarisessa analyysissä.

Desorptio-fotoionisaatio ilmanpaineessa (DAPPI) on kohtuullisen tuore API-tekniikka, joka esitettiin ensimmäistä kertaa vuonna 2007 (Haapala ym. 2007b). DAPPI:n tekniikka perustuu mikrosiruhöyrystimeen, joka suihkuttaa lämmitettyä ajoliuosta kohdepinnalle, johon on asetettu näytettä. Suihku aiheuttaa näytteiden desorptoitumisen kohdepinnalta. Kryptonpurkauslamppu ionisoi desorptoituneet näytemolekyylit, jotka ionisoiduttuaan ohjataan massaspektrometrille.

2.3 Erikoistyön tutkimustavoitteet

Erikoistyössä verrataan eri dopantteja lasisella mikrosiruhöyrystimellä kahdella eri liuotinseoksella. Lasisesta mikrosiruhöyrystimestä on kehitetty seuraavana versiona teräspuutihöyrystin. Höyrystimiä testataan eri ajo-olosuhteissa, ja höyrystimien suoriutumista verrataan keskenään ajo-olosuhdeparametrejä muuttamalla.

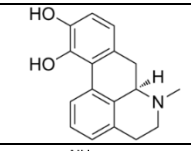
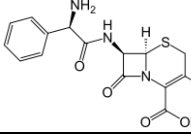
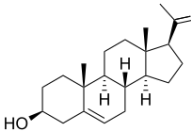
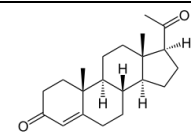
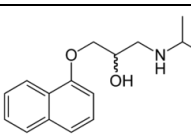
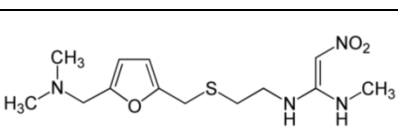
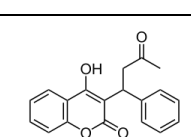
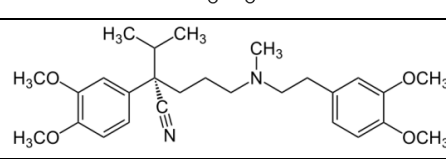
3 KOKEELLINEN OSA

3.1 Analyytit ja reagenssit

Erikoistyössä käytettiin kahdeksaa testiyhdistettä (Taulukko 3), jotka kaikki hankittiin Sigma-Aldrichilta (Steinheim, Saksa). Apomorfiinia (puhtaus 98,5 %) on lähinnä käytetty Parkinsonin taudin hoidossa ja joskus myös erektiolääkkeenä. Kefaleksiini (puhtaus 95 – 101 %) on yleisesti käytetty kefalosporiini-antibiootti, ja propranololia (puhtaus ≥ 99 %) käytetään edelleen sydämen rytmihäiriöiden, kohonneen verenpaineen hoidossa ja lievittäjänä. Ranitidiini (puhtaus ≥ 98 %) on H₂-salpaaja, jota käytetään vatsan liikahappoisuusoireisiin sekä maha-suolikanavien haavaumiin. Varfariini (puhtaus ≥ 98 %) on yleisessä käytössä verenohennuslääkkeenä, kun taas sepelvaltimotautiin ja kohonneen verenpaineen hoidossa aiemmin ollutta verapamiilia (puhtaus ≥ 99 %) ei enää käytetä kovin yleisesti. Pregnenolonilla (puhtaus ≥ 98 %) ja progesteronilla (puhtaus $\geq 99\%$) ei ole juurikaan terapeuttista käyttöä. Taulukossa 3 on esitetty testiyhdisteiden fysikaalisia ominaisuuksia ja rakennekaavat.

Liuottimina käytetyt metanoli (puhtaus 99,8 %), asetonitrili (puhtaus 99,8 %), sekä dopantteina käytetyt tolueeni (puhtaus 99,8 %), asetoni (puhtaus $\geq 99,9$ %), klooribentseeni (puhtaus 99,8 %) ja anisoli (puhtaus $\geq 99,0$ %) hankittiin Sigma-Aldrichilta. Veden puhdistukseen käytettiin Milliporen Milli-Q puhdistussysteemiä (Molsheim, Ranska). Kapillaarinestekromatografiassa käytetty ammoniumasetaatti (puhtaus ≥ 98 %) hankittiin myös Sigma-Aldrichilta.

Taulukko 3: Analyyttien fysikaalisia ominaisuuksia ja rakenteet.

	M (g/mol)	pKa	Rakenne
Apomorfiini	267,3	7,2; 8,9	
Kefaleksiini	347,4	5,2; 7,3	
Pregnenoloni	316,5	-	
Progesteroni	314,5	-	
Propranololi	259,3	9,5	
Ranitidiini	314,4	2,3; 8,2	
Varfariini	308,3	4,5	
Verapamiili	454,6	9,0	

3.2 Laitteisto

Massaspektrometrinä käytettiin PE Sciex API 3000 kolmoiskvadrupoli massaspektrometriä (Concord, Kanada). Massaspektrometrin kaasuvirtaukset ja jänniteparametrit, joilla säädetään analyytti-ionien kulkua massaspektrometrin sisällä, säädettiin optimaalisiksi ennen analyysiajoja. Analyysiohjelmistona käytettiin Analyst 1.5:ttä (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Näytteiden ja dopanttien

pumppaamiseen käytettiin PHD 2000-ruiskupumppua (Harvard Apparatus, Holliston, MA). APPI-lamppuna toimi PKS 100 kryptonpurkaus UV-lamppu 10 eV fotonienenergialla (Heraeus Noblelight Analytics Ltd., Cambridge, UK). Teholähteenä oli IPS-603 (RS Components Corby, Northants, UK). Apukaasun virtaussäätimenä käytettiin Aalborgin GCF17-massavirtaussäädintä (Orangeburg, NY). Laitteiston telineenä, jossa mm. UV-lamppu oli kiinni, käytettiin Proxeon Biosystems'ien xyz-tasojä (Odense, Tanska). Nestekromatografi oli Agilentin 1100 kapillaari-LC (Waldbronn, Saksa). Kolonnina käytettiin Watersin SymmetryShield RP18 300 µm x 100 mm -kolonnia 3,5 µm partikkelikoolle.

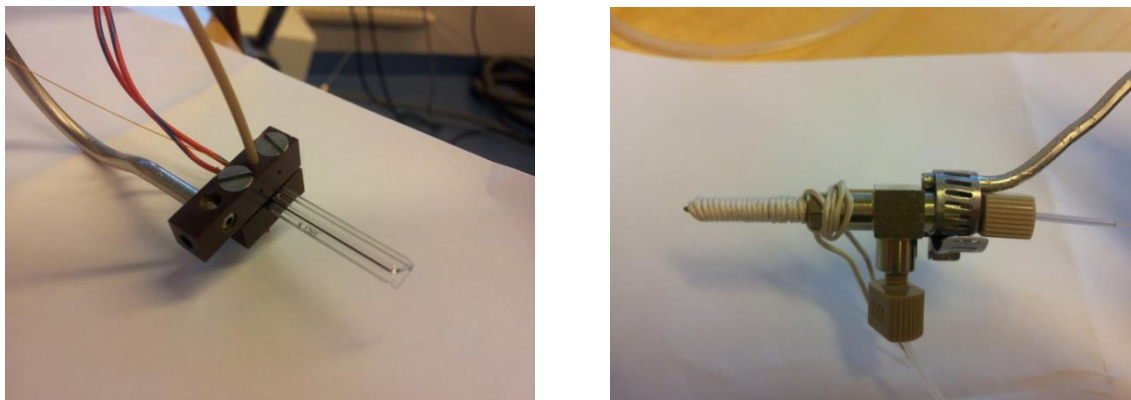
Mikrosiru/teräspanputki kiinnitettiin erillisellä kiinnitysosalla säädettävään xyz-tasoon siten, että sirun/putken kaasun ulosvirtausaukko oli noin 1 cm:n etäisyydellä massaspektrometrin sisäänmenoaukosta. Kryptonvarauslamppu oli heti höyrystimen vieressä noin 1 cm:n etäisyydellä MS:n sisäänmenoaukosta. Höyrystimien lämmitys tapahtui ulkoisella teholähteellä.

Lasinen mikrosiru ja teräspanputkihöyrystin (Kuva 1) saatiin tätä erikoistytötä varten valmiina suoraan käyttöön. Mikrosirun valmistus perustuu kahden lasilevyn muokkaamiseen ja yhteen liittämiseen siten, että levyjen väliin jää kapillaarikanavia näytteiden ja apukaasun virtausta varten. Mikrosirun lämmitys tapahtuu ulkoisella virtalähteellä siruun integroitujen platinaosien avulla. Mikrosirun tarkempi valmistusprosessi on esitetty Haapalan 2010 väitöskirjassa (Haapala 2010).

Teräspanputkihöyrystin on valmistettu teräksisestä T-kappaleesta, jonka sisällä on kapillaarikanava näytteitä ja apukaasua varten. Apukaasu ja näyteliuos johdetaan putkeen kahdesta erillisestä T-kappaleen kanavasta, jotka yhtyvät samaan ulosyöttökanavaan. Putken lämmityksessä käytetään vastuslankaa, joka on kieritetty ulosyöttöputken ympärille.

Ulosvirtauskaasun lämpötilan mittaamista varten lasisiru/teräspanputki asetettiin välikappaleen avulla telineeseen, jota pystyttiin liikuttamaan xyz-tasoissa tietokoneen avulla. Lämpötilan mittausanturi asetettiin 10 mm:n etäisyydelle

lasisirusta/teräsputkesta. Lasisirun/teräsputken läpi ohjattiin sumutinkaasua 60 ml/min ja 100 ml/min nopeuksilla, ja lämmitystehoa nostettiin vähitellen puolen watin askelein. Näytteenä käytettiin puhdasta tolueenia.



Kuva 1: Lasinen mikrosiruhöyrystin ja teräsputkihöyrystin pidikkeissään, © Riikka Räsänen 2013.

3.3 Näytteiden valmistus

Kaikista analyyteistä valmistettiin 10 mM kantaliuokset metanoliin. Ajo-olosuhteiden vertailua varten apomorfiinista, progesteronista, varfariinista ja verapamiilista valmistettiin liuokset (10 μ M) suoraan dopanttiin. Käytetyt dopantit olivat tolueeni, asetoni sekä 0,5 % anisolia tolueenissa.

Dopanttien vertailua varten apomorfiinista, kefaleksiinista, pregnenolonista, ranitidiinista ja varfariinista valmistettiin 10 μ M ajoliuokset metanoli-vesi (70:30) sekä asetonitriili-vesi (70:30) – liuotinseoksiin (näyteryhmä 1). Progesteronista, propranololista ja verapamiilista valmistettiin 1 μ M ajoliuokset samoihin liuotinseoksiin (näyteryhmä 2). Vertailussa käytettiin kaikkia neljää eri dopanttia puhtasaineina, lukuun ottamatta anisolia, joka lisättiin tolueeniin 0,5 % pitoisuuteen. Vertailussa sumutinkaasun virtausnopeus oli 60 ml/min, höyrystimen lämmitysteho 4,0 W sekä näytteen virtausnopeus 6 μ l/min.

CapLC-ajoissa analyytit liuotettiin yhteen metanoliliuokseen 10 μM :n konsentraatioon. CapLC:n kanssa käytetty ammoniumasetaattiliuos (10 mM) suodatettiin ennen sen lisäämistä capLC-ajoliuokseen.

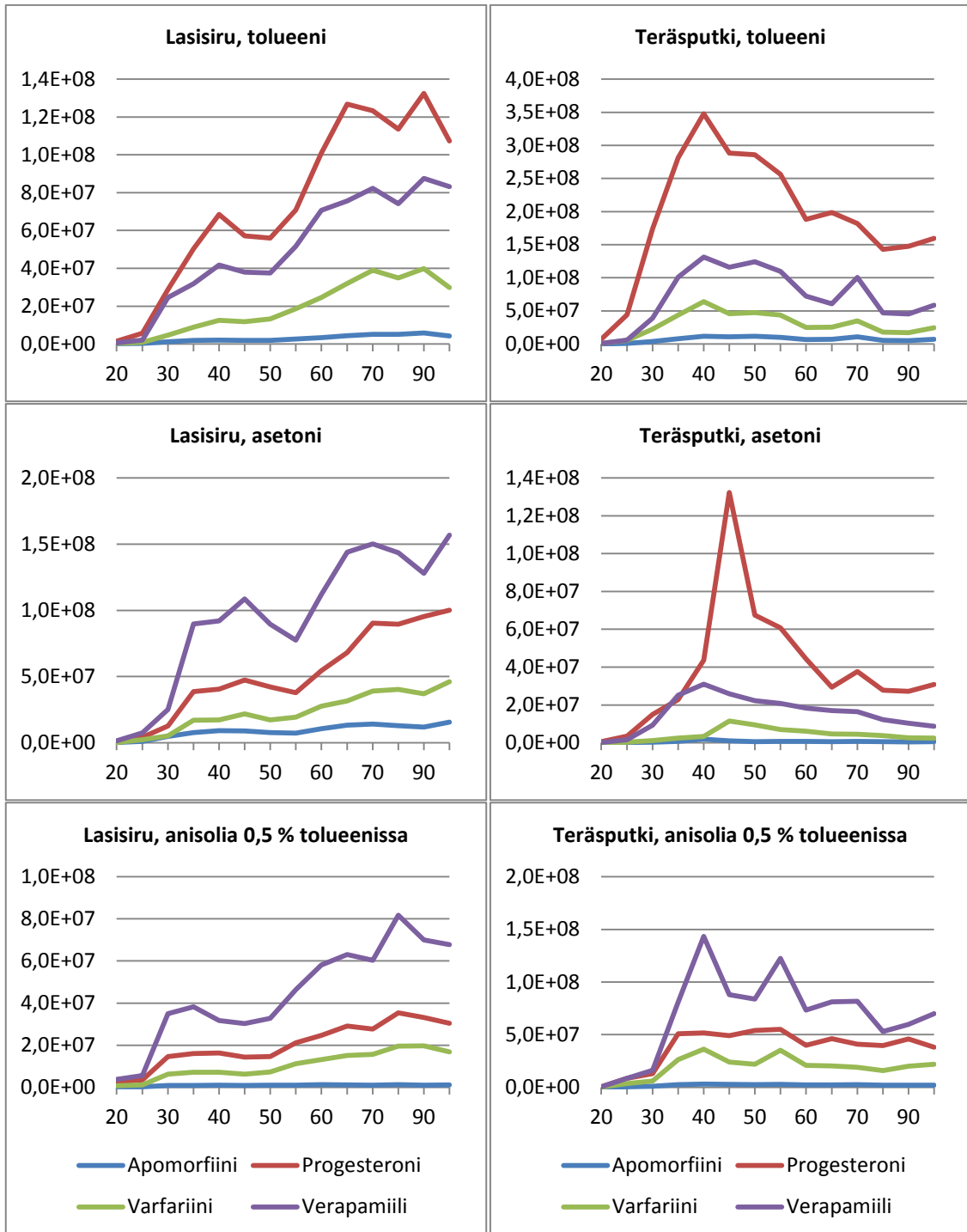
4 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

4.1 Ajo-olosuhteiden vaikutus signaalin intensiteettiin

Lasista mikrosiruhöyrystintä ja teräspuutihöyrystintä verrattiin keskenään, kun analyysiajojen olosuhdeparametreja (sumutinkaasun virtausnopeus, näytteen virtausnopeus sekä höyrystimen lämmitysteho) muutettiin yksi kerrallaan. Spektrejä kerättiin 1 min ajan ja ne summattiin yhteen. Dopanteina käytettiin asetonia, tolueenia ja anisolia 0,5 % tolueenissa. Kuvaajat ovat muodostettu isotoopin C13 spektreistä, koska C12-spektrien huomattiin olevan saturoituneita analyysiajojen jälkeen, eikä niistä näin ollen olisi saanut luotettavia tuloksia.

4.1.1 Sumutinkaasun virtausnopeuden vaikutus

Sumutinkaasun virtausnopeuden vaikutuksen testaaminen aloitettiin nopeudesta 20 ml/min. Virtausnopeutta nostettiin 5 ml/min pykälän ainoastaan 60 ml/min asti. Tämän jälkeen virtausnopeutta nostettiin 10 ml/min välein 100 ml/min asti, minkä jälkeen testi lopetettiin. Kuvassa 2 on esitetty analyyttien signaalien intensiteetit sumutinkaasun virtausnopeuden funktiona.



Kuva 2: Analyyttien signaalien intensiteetti (cps) sumutinkaasun virtausnopeuden funktiona (ml/min). Näytteen virtausnopeus = 5 μ l/min, lämmitysteho 5 W lasisiru / 10 W teräsputki, c = 10 μ M.

Sumutinkaasun virtausnopeuden profiilit ovat erilaiset lasisirun ja teräsputken välillä (Kuva 2). Taulukkoon 4 on koottu sumutinkaasun virtausnopeudet, joilla saavutettiin analyttien signaalien maksimi-intensiteetit eri dopantteja käytettäessä. Lasisirulla

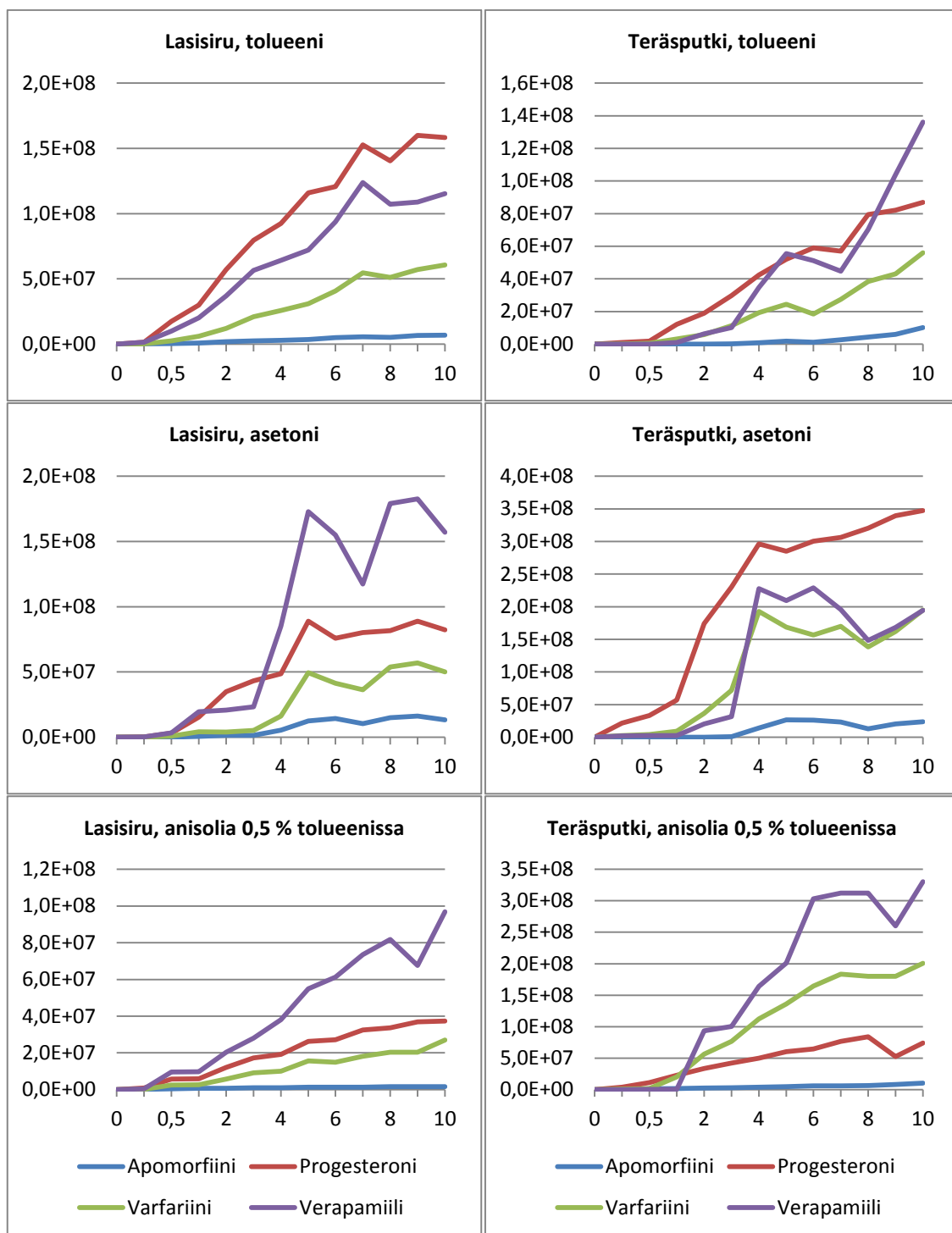
analyyttien signaalien vahvimmat intensiteetit saavutettiin noin 80 – 100 ml/min kohdalla, jonka jälkeen intensiteetit pysyvät suhteellisen stabiileina. Teräsputkella signaalien korkeimmat intensiteetit saavutettiin noin 40 – 45 ml/min kohdalla, jonka jälkeen intensiteetit pysyvät stabiilina tai alkoivat heiketä.

Taulukko 4: Sumutinkaasun virtausnopeudet, joilla saavutettiin analyyttien signaalien maksimi-intensiteetit eri dopanteilla (ml/min).

	Tolueeni	Asetoni	Anisolia 0,5 % tolueenissa
Apomorfiini (lasisiru)	90	100	60
Progesteroni (lasisiru)	90	100	80
Varfariini (lasisiru)	90	100	80
Verapamiili (lasisiru)	90	100	80
Apomorfiini (teräsputki)	40	60	40
Progesteroni (teräsputki)	40	45	55
Varfariini (teräsputki)	40	45	40
Verapamiili (teräsputki)	40	40	40

4.1.2 Näytteen virtausnopeuden vaikutus

Näytteen virtausnopeuden vaikutuksen mittaaminen aloitettiin pienimmästä mahdollisesta virtausnopeudesta, joka käytössä olleella ruiskupumpulla oli mahdollista saavuttaa (0,16 µl/min). Nopeutta nostettiin ensin 0,5 ja 1,0 µl:aan/min, minkä jälkeen virtausnopeutta nostettiin 1,0 µl/min kerrallaan aina 10 µl:aan/min asti. Kuvassa 3 on esitetty analyyttien signaalien intensiteetti näytteen virtausnopeuden funktiona.



Kuva 3: Analyyttien signaalien intensiteetti (cps) näytteen virtausnopeuden funktiona (μl/min). Sumutinkaasun virtausnopeus = 60 ml/min, lämmitysteho 5 W lasisiru / 10 W teräsputki, $c = 10 \mu\text{M}$.

Taulukkoon 5 on koottu näytteen virtausnopeudet, joilla saavutettiin analyyttien signaalien maksimi-intensiteetit eri dopantteja käytettäessä. Näytteen virtausnopeuden profiilit ovat samankaltaisia lasisirun ja teräsputken välillä. Maksimi-intensiteetit

saavutettiin useimmiten silloin, kun virtausnopeus oli huipussaan tai lähellä huippua. Asetonia käytettäessä dopanttina progesteronista saatiin lasisirulla voimakkaimmat signaalit jo yllättävän alhaisilla nopeuksilla. Teräsputkella puolestaan varfariinista ja verapamiilista saatiin voimakkaimmat signaalit alhaisilla nopeuksilla, kun dopanttina käytettiin asetonia.

Taulukko 5: Näytteen virtausnopeudet, joilla saavutettiin analyyttien signaalien maksimi-intensiteetit eri dopanteilla ($\mu\text{l}/\text{min}$). Yhtä voimakkaat signaalit on erotettu vinoviivalla.

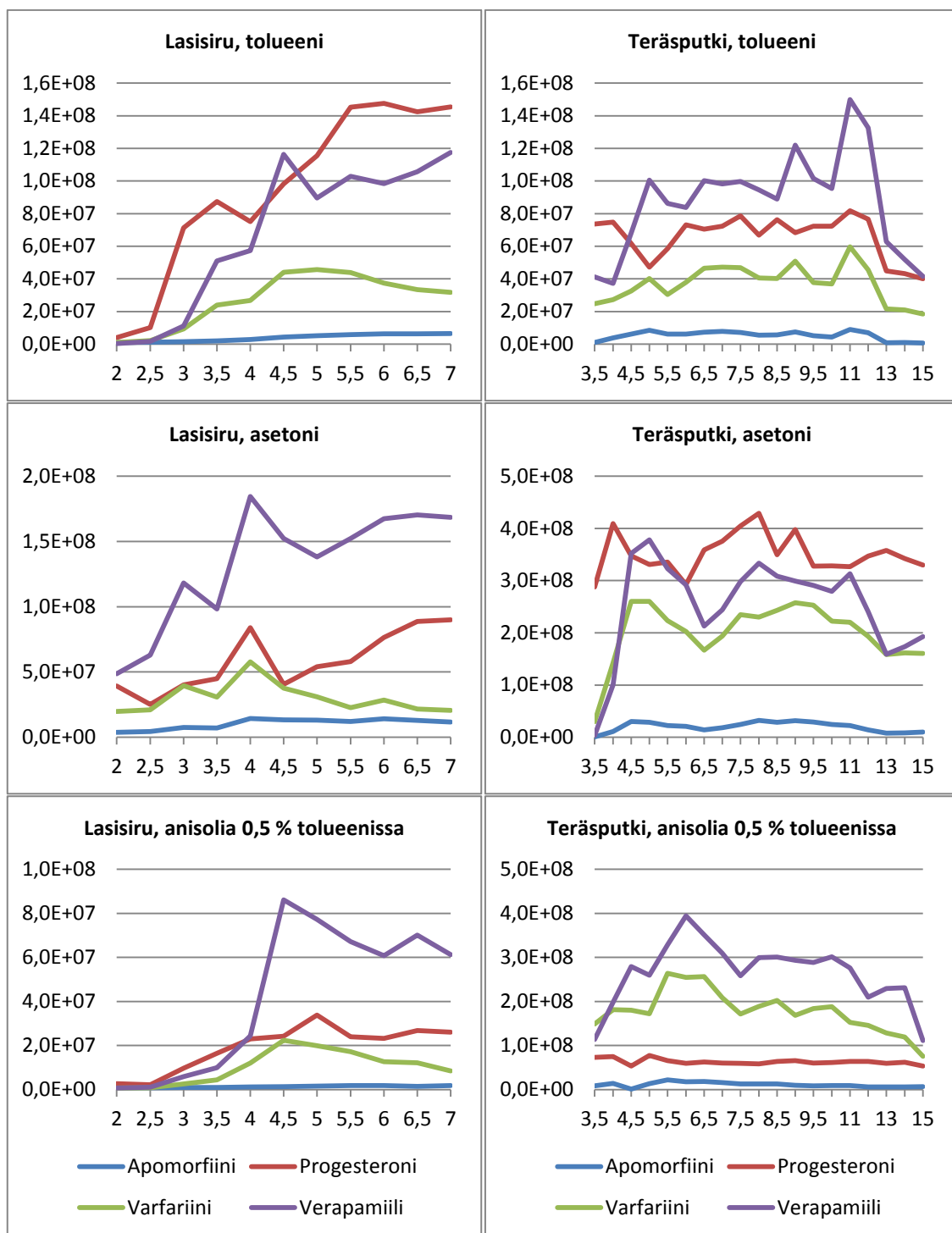
	Tolueeni	Asetoni	Anisolia 0,5 % tolueenissa
Apomorfiini (lasisiru)	10	9	10
Progesteroni (lasisiru)	9	5 / 9	10
Varfariini (lasisiru)	10	9	10
Verapamiili (lasisiru)	7	9	10
Apomorfiini (teräsputki)	10	5	10
Progesteroni (teräsputki)	10	10	8
Varfariini (teräsputki)	10	4 / 10	10
Verapamiili (teräsputki)	10	4 / 6	10

4.1.3 Lämmitystehon vaikutus

Höyrystimen lämmitystehon vaikutusta alettiin mitata lasisirulla 2 W:sta ja teräsputkella 3,5 W:sta. Lasisirun kuumentamista jatkettiin ainoastaan 7 W:iin saakka 0,5 W:n askelein, koska sirun lämpötila nousee huomattavasti teräsputkea voimakkaammin jo alhaisilla lämmitystehoilla (Kuva 5). Lämpötilamittaukset analysoidaan tarkemmin tutkielman seuraavassa osiossa. Teräsputkea lämmitettiin 0,5 W:n askelein 10 W:iin saakka, minkä jälkeen lämmitystehoa nostettiin 1 W välein 15 W:iin asti. Kuvassa 4 on esitetty analyyttien signaalien intensiteetti höyrystimen lämmitystehon funktiona.

Höyrystimen lämmitystehon vaikutus analyyttien signaalin intensiteettiin oli erilainen lasisirun ja teräsputken välillä (Kuva 4, Taulukko 6). Toisaalta myös eri dopanttien välillä oli eroa siinä, miten höyrystin reagoi lämmitystehon muutoksiin. Esimerkiksi teräsputkea sai lämmittää tolueenin kanssa 11 W:n teholla ennen kuin vahvimmat intensiteetit saavutettiin, kun taas anisolin 0,5 % tolueenissa kanssa maksimi-intensiteetit saavutettiin jo 5 – 6 W:ssa (Taulukko 6). Tosin teräsputkella signaalit säilyivät suhteellisen stabiilina mittausalueella 5 – 11 W kaikilla dopanteilla.

Lasisirulla lämmitystehon optimiarvo osuu noin 4,5 – 5 W:n tienoille (Taulukko 6). Suurimmalla osalla analyyteistä signaalin intensiteetti ei enää kasvanut uuteen huippuintensiteettiin, kun lasisirun lämmitystehoa nostettiin yli 4,5 – 5 W:n.



Kuva 4: Analyyttien signaalien intensiteetti (cps) höyrystimen lämmitystehon funktiona (W). Sumutinkaasun virtausnopeus = 60 ml/min, näytteen virtausnopeus = 6 µl/min, c = 10 µM.

Taulukko 6: Höyrystimen lämmitystehot, joilla saavutettiin analyyttien signaalien maksimi-intensiteetit eri dopanteilla (W). Yhtä voimakkaat signaalit on erotettu vinoviivalla.

	Tolueeni	Asetoni	Anisolia 0,5 % tolueenissa
Apomorfiini (lasisiru)	7	4 / 6	7
Progesteroni (lasisiru)	6	7	5
Varfariini (lasisiru)	5	4	4,5
Verapamiili (lasisiru)	4,5 / 7	4	4,5
Apomorfiini (teräsputki)	11	8 / 9	5
Progesteroni (teräsputki)	11	8	5
Varfariini (teräsputki)	11	4,5 / 5	5,5
Verapamiili (teräsputki)	11	5	6

4.1.4 Yhteenveto ajo-olosuhdemittausten vaikutuksista

Yhteenvedossa verrataan, kummalla höyrystimellä analyytit näkyivät voimakkaammin ajo-olosuhdemittauksissa. Taulukossa 7 on esitetty analyyttien signaalien intensiteettien suhteelliset maksimivoimakkuudet ajo-olosuhteiden vaikutusmittauksista sekä lasisirulla että teräsputkella.

Teräsputkella saatiin apomorfiinista, progesteronista, varfariinista ja verapamiilista suurimmaksi osaksi voimakkaammat signaalit kuin lasisirulla (Taulukko 7). Teräsputkella analyytit näkyivät muutamaa apomorfiinilla kohdattua poikkeusta lukuun ottamatta vähintään hyvin dopantista riippumatta, ja useimmiten signaali oli intensiivinen tai jopa erittäin intensiivinen.

Lasisiru tuotti huomattavasti heikompia signaaleja analyyteistä, kun dopanttina käytettiin anisolia 0,5 % tolueenissa (Taulukko 7). Teräsputkella puolestaan anisoli 0,5 % tolueenissa tuotti keskimäärin yhtä vahvat signaalit kuin tolueenia tai asetonia käytettäessä.

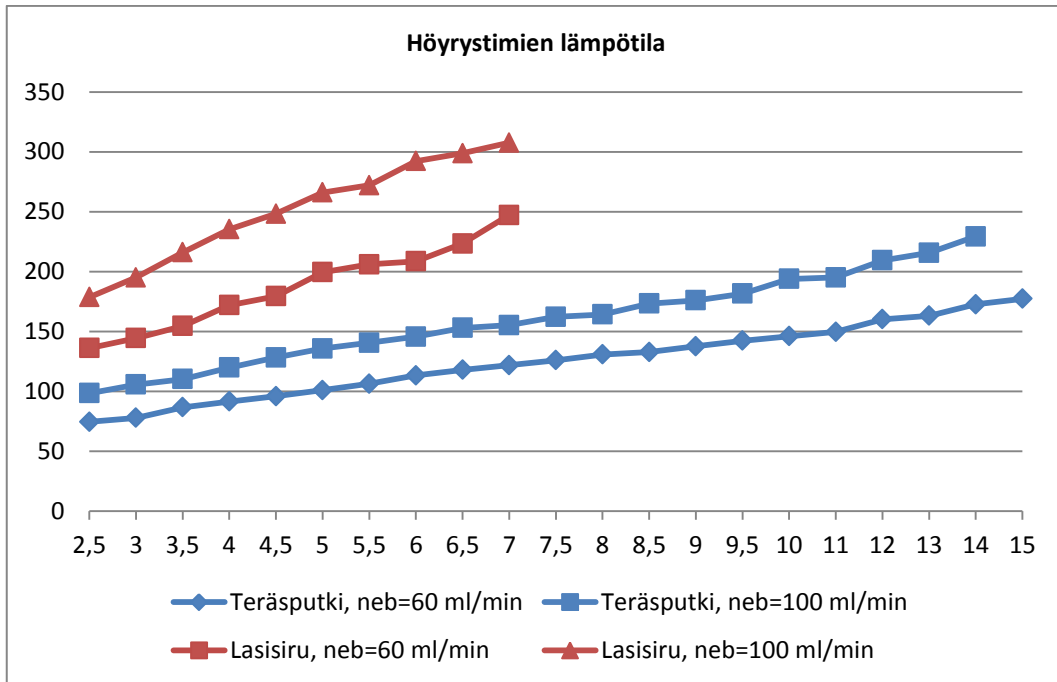
Apomorfiini näkyi huomattavasti heikommin kuin muut analyytit (Taulukko 7). Teräsputkella kuitenkin saatiin voimakkaammat signaalit apomorfiinista kuin lasisirulla. Lisäksi lasisirulla apomorfiini näkyi ainoastaan asetonin ollessa dopanttina, kun taas teräsputkella apomorfiinista saatiin selvä signaali kaikilla dopanteilla.

Taulukko 7: Analyyttien signaalien intensiteettien maksimivoimakkuudet ajo-olosuhteiden vaikutusmittauksista. +++ = näkyy erittäin intensiivisenä ($\text{cps} > 1,0 \times 10^8$), ++ = näkyy intensiivisenä ($\text{cps} 5,0 \times 10^7 - 1,0 \times 10^8$), + = näkyy hyvin ($\text{cps} 1,0 \times 10^7 - 5,0 \times 10^7$), - = näkyy heikosti tai ei ollenkaan ($\text{cps} < 1,0 \times 10^7$). Tulokset eri testeistä on eroteltu vinoviivalla (sumutinkaasun virtausnopeus / näytteen virtausnopeus / höyrystimen lämmitysteho).

	Tolueeni	Asetoni	Tolueeni + 0,5 % anisoli
Apomorfiini (lasisiru)	- / - / -	+ / + / -	- / - / -
Progesteroni (lasisiru)	+++ / +++ / +++	+++ / ++ / ++	+ / + / +
Varfariini (lasisiru)	+ / ++ / +	+ / ++ / ++	+ / + / +
Verapamiili (lasisiru)	++ / +++ / +++	+++ / +++ / +++	++ / ++ / ++
Apomorfiini (teräsputki)	+ / + / -	- / + / +	- / + / +
Progesteroni (teräsputki)	+++ / ++ / ++	+++ / +++ / +++	++ / ++ / ++
Varfariini (teräsputki)	++ / ++ / ++	+ / +++ / +++	+ / +++ / +++
Verapamiili (teräsputki)	+++ / +++ / +++	+ / +++ / +++	+++ / +++ / +++

4.2 Höyrystimien lämpötilan mittaaminen

Höyrystimien lämpötilan mittaaminen aloitettiin 2,5 W:sta sekä lasisirulla että teräsputkella. Lasisirulla mittausta jatkettiin 7 W:iin saakka 0,5 W:n tehon kertalaisyksellä. Teräsputkella mittausta jatkettiin ensin 10 W:iin asti 0,5 W:n askelin, minkä jälkeen tehoa nostettiin 15 W:iin asti 1 W:n välein. Kuvassa 5 on esitetty ulosvirtaavan kaasun lämpötila tehon funktiona.



Kuva 5: Lasisirun ja teräsputken lämpötila lämmitystehon funktiona.

Kuvasta 5 nähdään, että lasisirun ulosvirtauskaasun lämpötila oli huomattavasti korkeampi kuin teräsputkella vastaavilla lämmitystehoilla. Lasisirulla kaasun lämpötila myös kohosi voimakkaammin kuin teräsputkella, kun lämmitystehoa nostettiin. Teräsputkella kaasu ei saavuttanut lasisirun tuottamaa maksimilämpötilaa, vaikka sitä lämmitettiin huomattavasti suuremmalla teholla. Suuremmalla sumutinkaasun virtausnopeudella kaasun lämpötila nousi korkeammaksi sekä lasisirulla että teräsputkella.

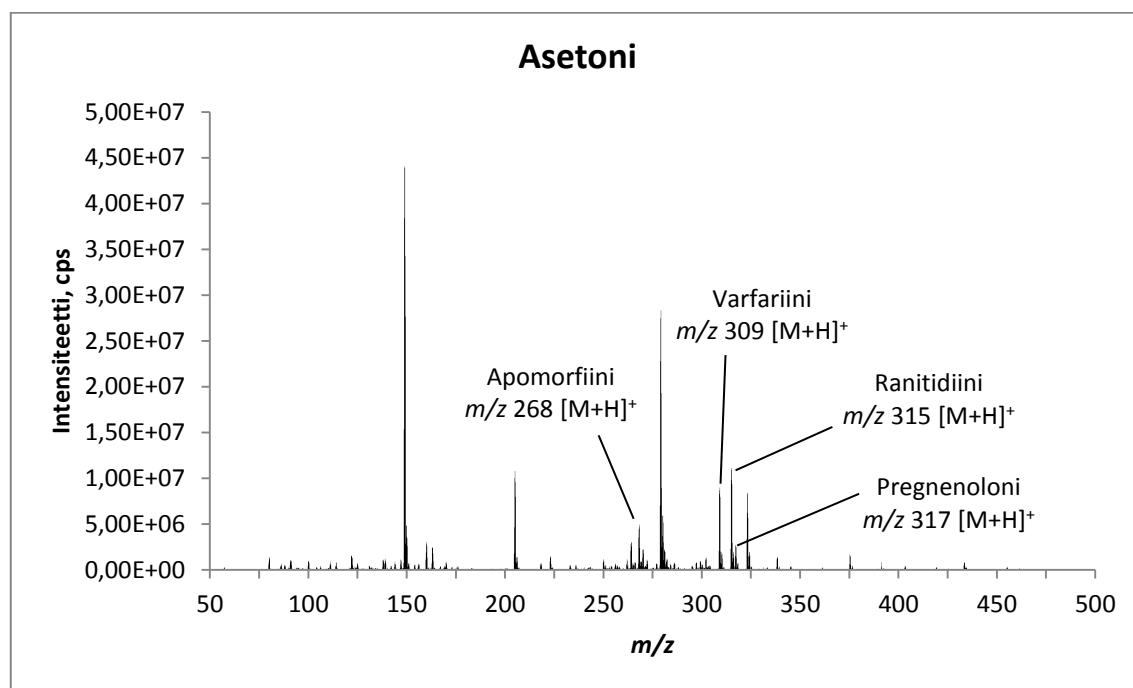
Teräsputki ei näyttäisi lämpiävän yhtä tehokkaasti kuin lasisiru, millä voi olla vaikutusta analyyttien ionisoitumiseen (Kuva 5). Alhainen lämpötila voisi muodostua ongelmaksi varsinkin korkean kiehumispisteen omaavilla analyyteillä. Teräsputken tehokkaampi lämpeneminen voisi olla tulevaisuudessa tärkeä kehittämiskohde seuraavalle höyrystimen versiolle.

4.3 Dopanttien vaikutus signaalien intensiteettiin

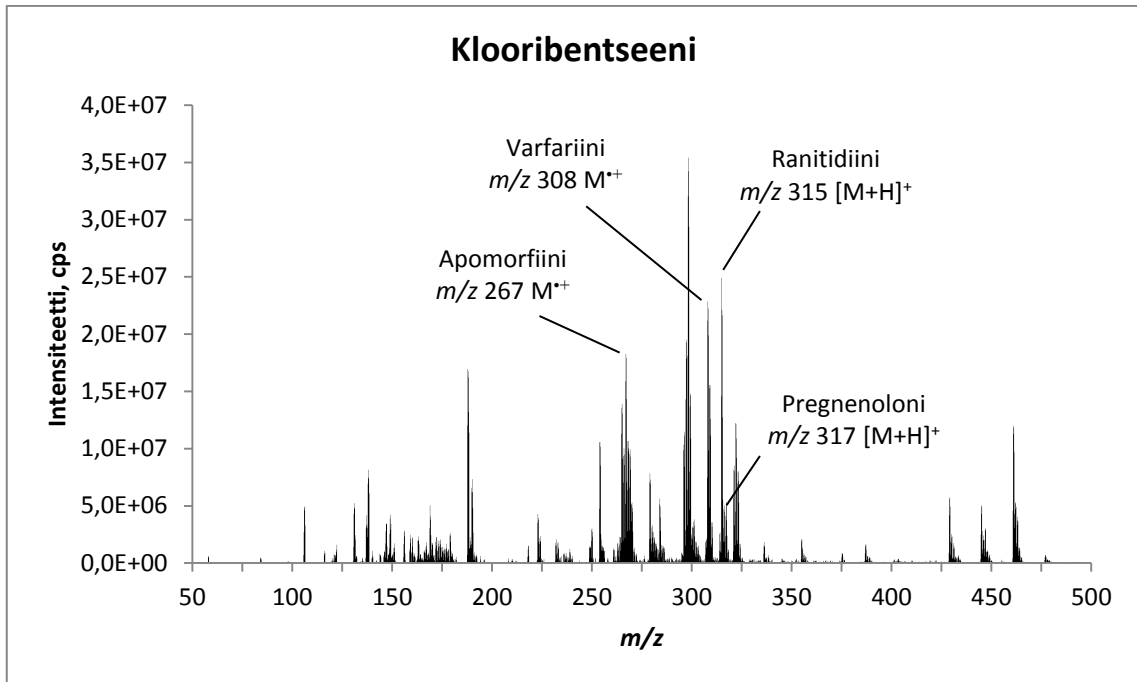
Dopanttien vertailulla oli tarkoitus löytää sopiva dopantti seuraavia capLC-tutkimuksia varten. Dopantteina käytettiin asetonia, klooribentseeniä, tolueenia ja anisolia 0,5 % tolueenissa. Vertailu suoritettiin lasisella mikrosirulla.

4.3.1 Metanoli-vesi

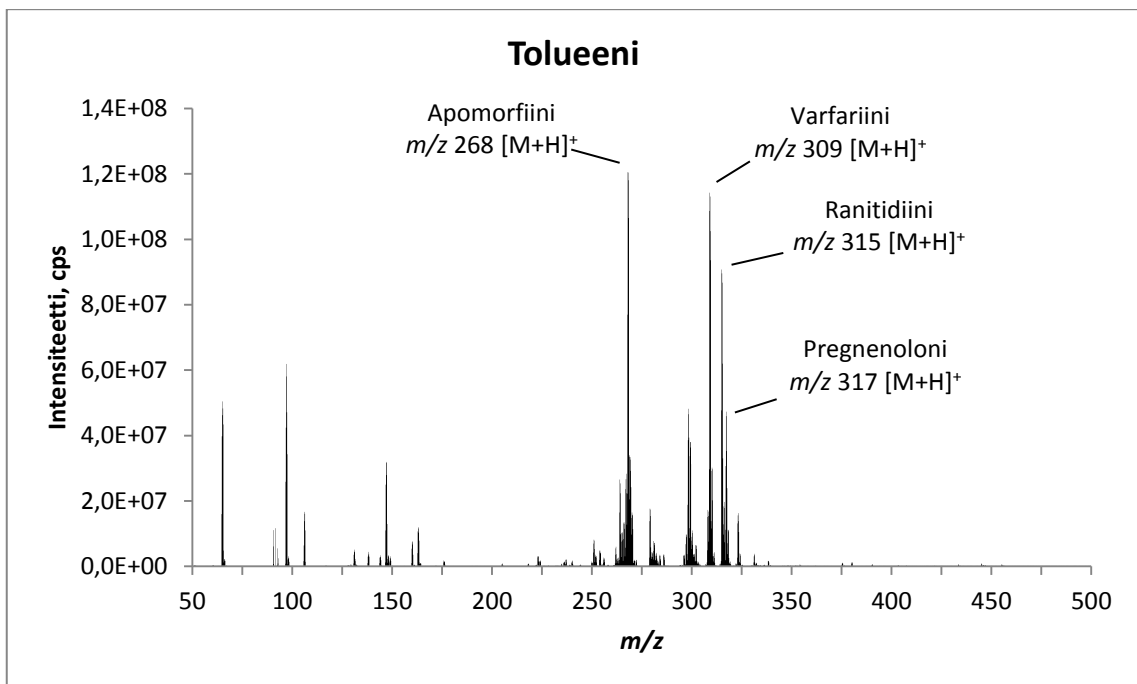
Kuvissa 6a-d on esitetty näyteryhmän 1 spektrit eri dopantteja käytettäessä metanoli-vesi-seoksessa. Kaikista spektreistä on vähennetty tausta, joka oli mitattu pelkällä dopantilla samoissa ajo-olosuhteissa kuin näytteet. Spektreissä on summattuna 20 spektriä päällekkäin.



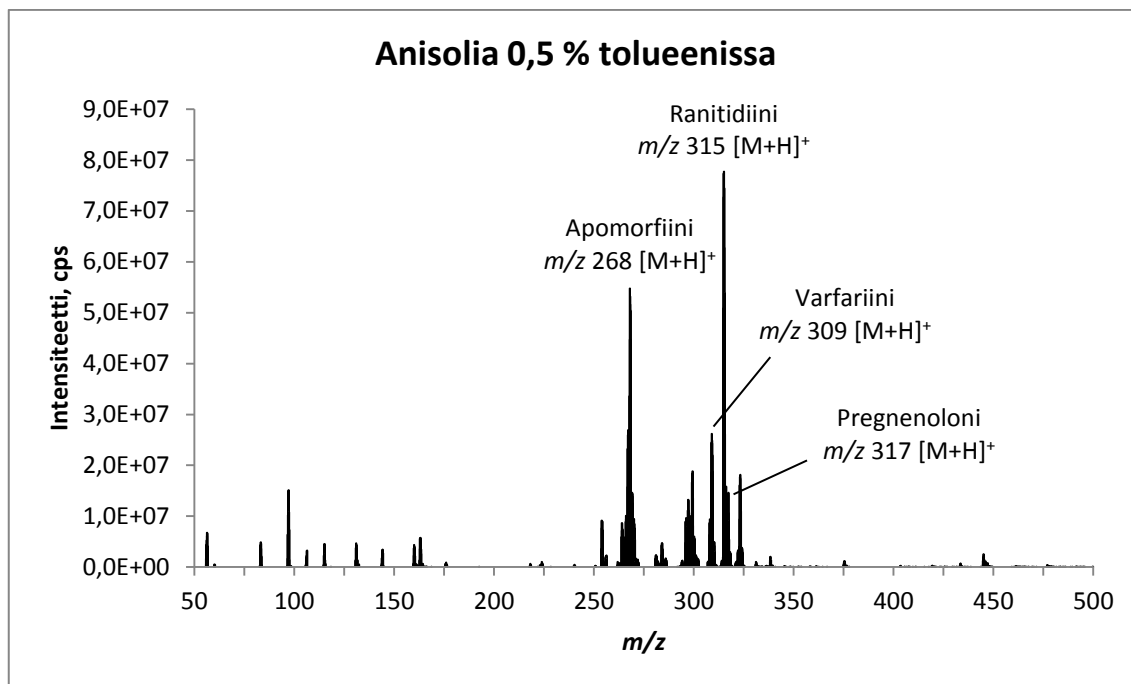
Kuva 6a: Näyteryhmän 1 spektri. Asetoni dopanttina, lasisiru.



Kuva 6b: Näytteryhmän 1 spektri. Klooribentseeni dopanttina, lasisiru.



Kuva 6c: Näytteryhmän 1 spektri. Tolueeni dopanttina, lasisiru.

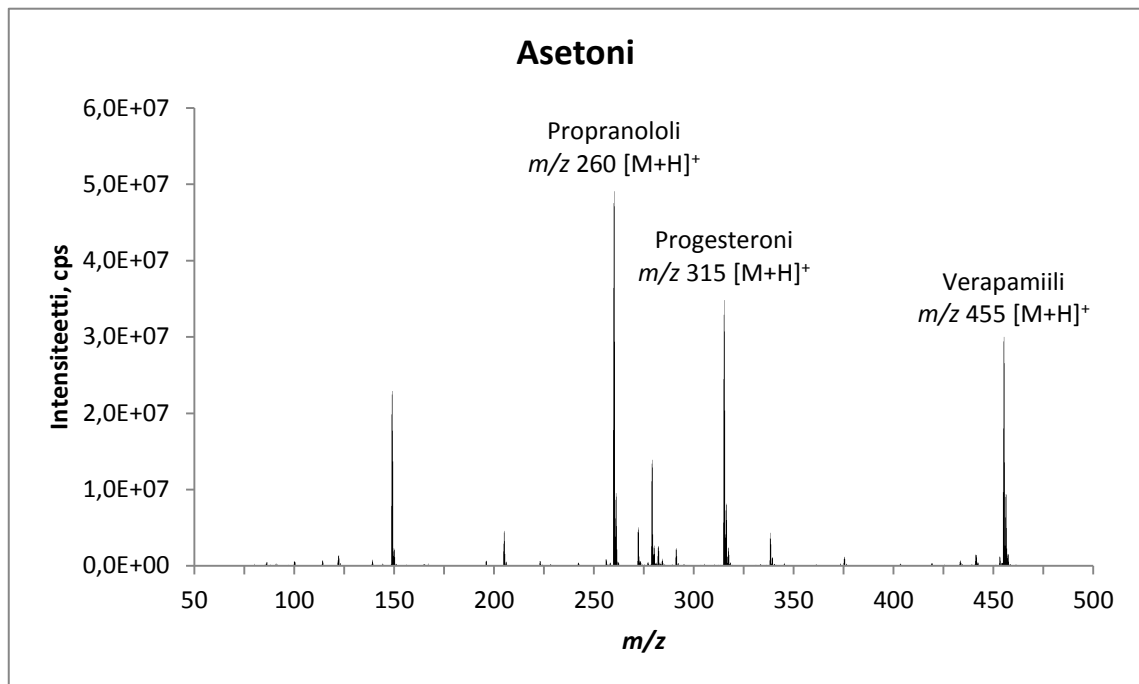


Kuva 6d: Näyteryhmän 1 spektri. Anisolia 0,5 % tolueenissa dopanttina, lasisiru.

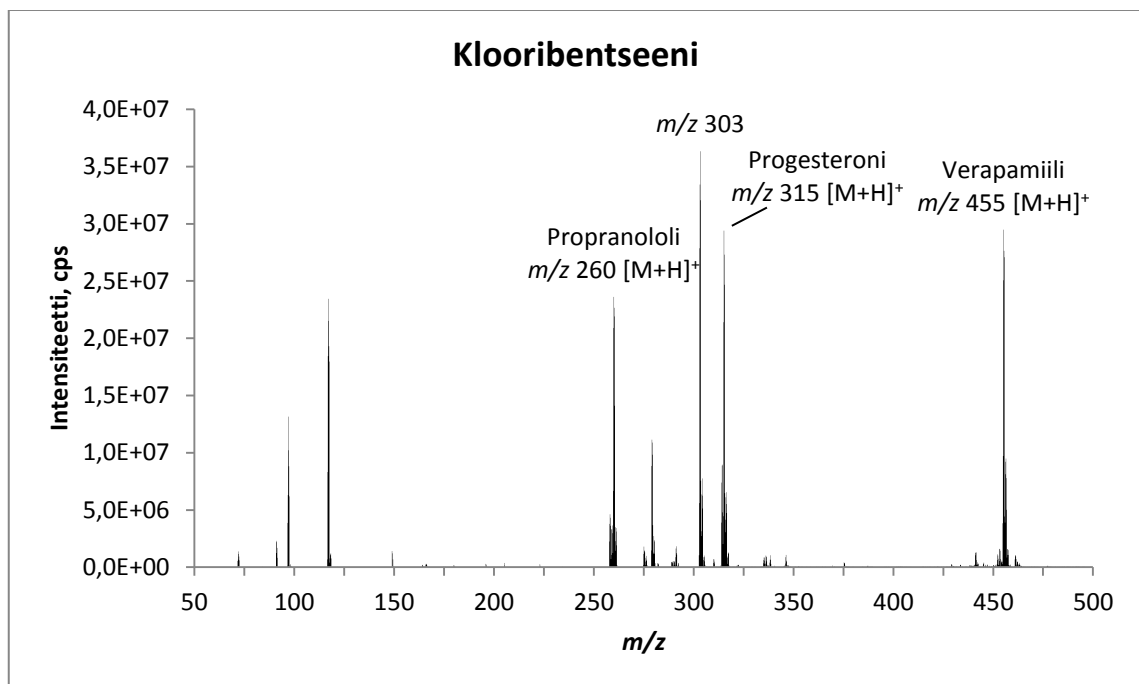
Asetonia, tolueenia ja anisolia 0,5 % tolueenissa käytettäessä dopanttina analyyteistä muodostui protonoitunut molekyyli $[M+H]^+$ (Kuvat 6a, c ja d). Sen sijaan klooribentseeniä käytettäessä apomorfiinista ja varfariinista muodostui vahvin signaali radikaalikationille (M^{*+}), ja ranitidiinista ja pregnenolonista muodostui protonoitunut molekyyli (Kuva 6b). Myös muut dopantit muodostivat apomorfiinista radikaalikationin protonoituneen molekyylin lisäksi, mutta protonoitunut molekyyli tuotti niillä voimakkaamman signaalin kuin radikaalikationi.

Voimakkaimmat signaalit analyyteille saavutettiin silloin, kun dopanttina käytettiin tolueenia. Varsinkin apomorfiinin signaalin intensiteetti oli tolueenilla huomattavasti voimakkaampi kuin muilla dopanteilla (Taulukko 8). Toiseksi voimakkain signaali apomorfiinista saatiin anisolilla 0,5 % tolueenissa. Myös pregnenolonin signaali oli tolueenilla selvästi voimakkaampi kuin muilla dopanteilla. Pregnenoloni näkyi suhteellisen hyvin myös anisolilla 0,5 % tolueenissa. Kefaleksiini ei tuottanut näkyvää signaalia minkään dopantin kanssa.

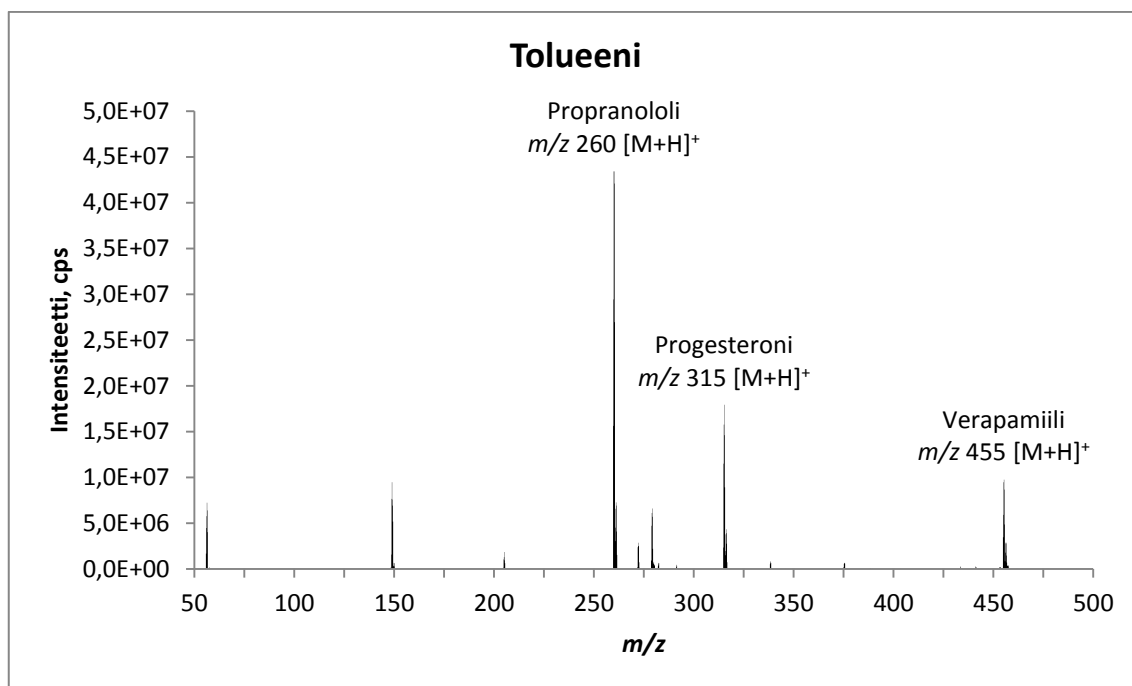
Kuvassa 7a-d on esitetty näyteryhmän 2 spektrit eri dopanteja käytettäessä.



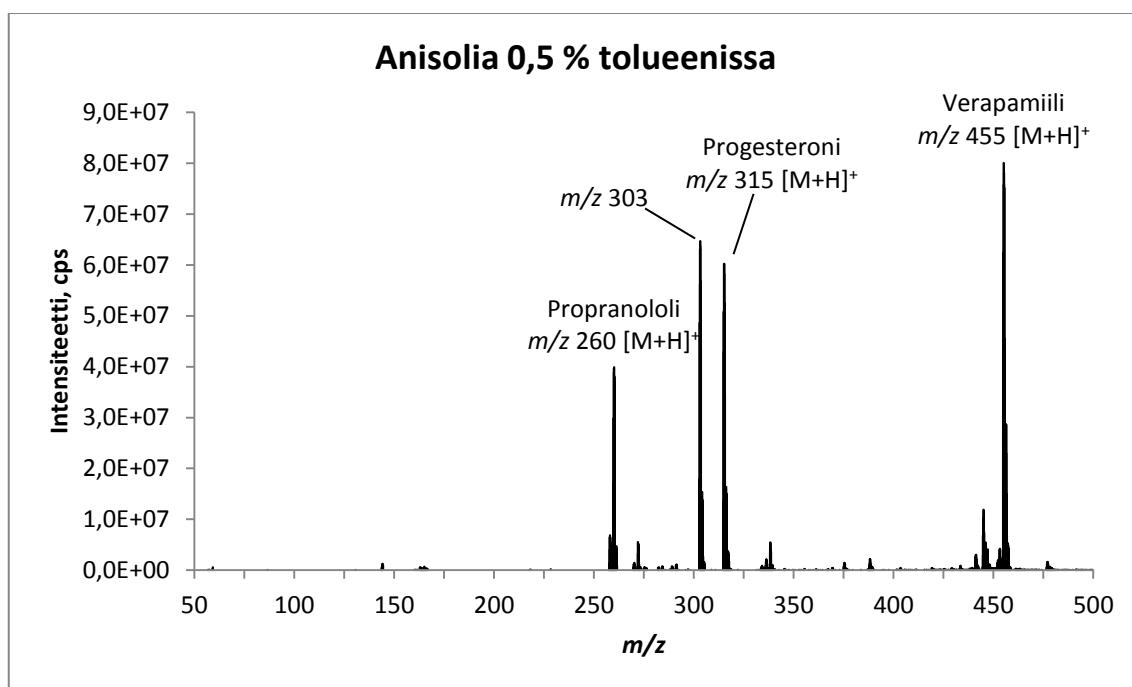
Kuva 7a: Näytteryhmän 2 spektri. Asetoni dopanttina, lasisiru.



Kuva 7b: Näytteryhmän 2 spektri. Klooribentseeni dopanttina, lasisiru.



Kuva 7c: Näytteryhmän 2 spektri. Tolueeni dopanttina, lasisiru.



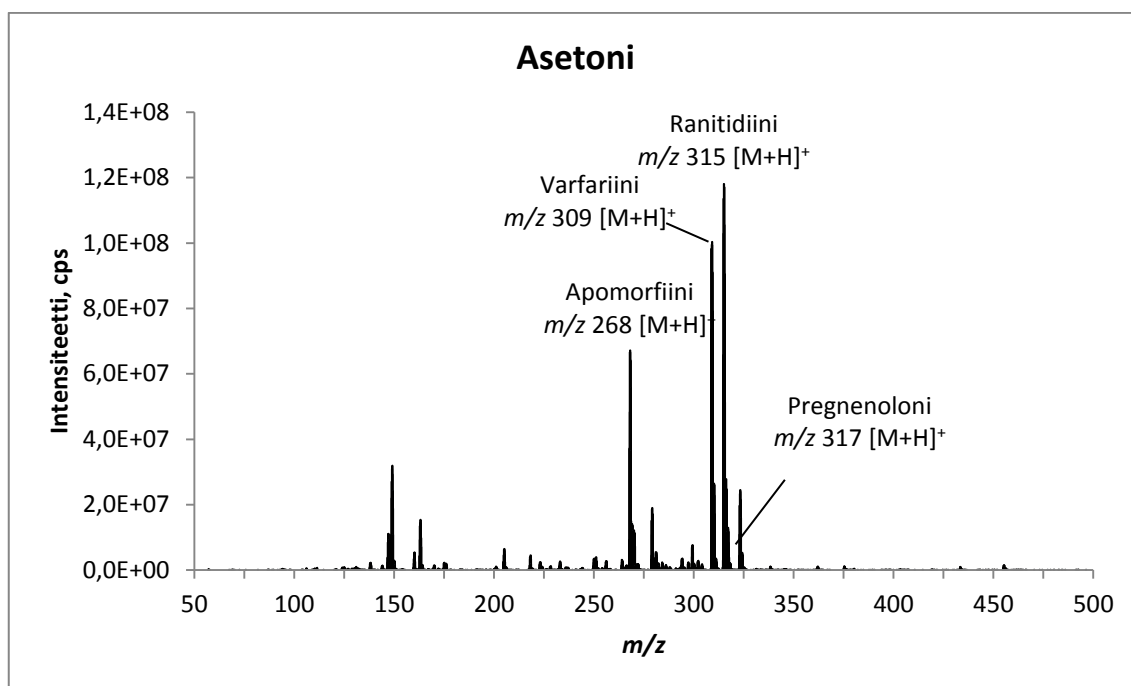
Kuva 7d: Näytteryhmän 2 spektri. Anisolia 0,5 % tolueenissa dopanttina, lasisiru.

Propranololi, progesteroni ja verapamiili muodostivat molekyyli-ionin $[M+H]^+$ jokaisella dopantilla (Kuvat 7a-d). Voimakkaimmat analyyttien signaalit saatiin anisoliilla 0,5 % tolueenissa (Taulukko 8). Muilla dopanteilla analyytit näkyivät lähes

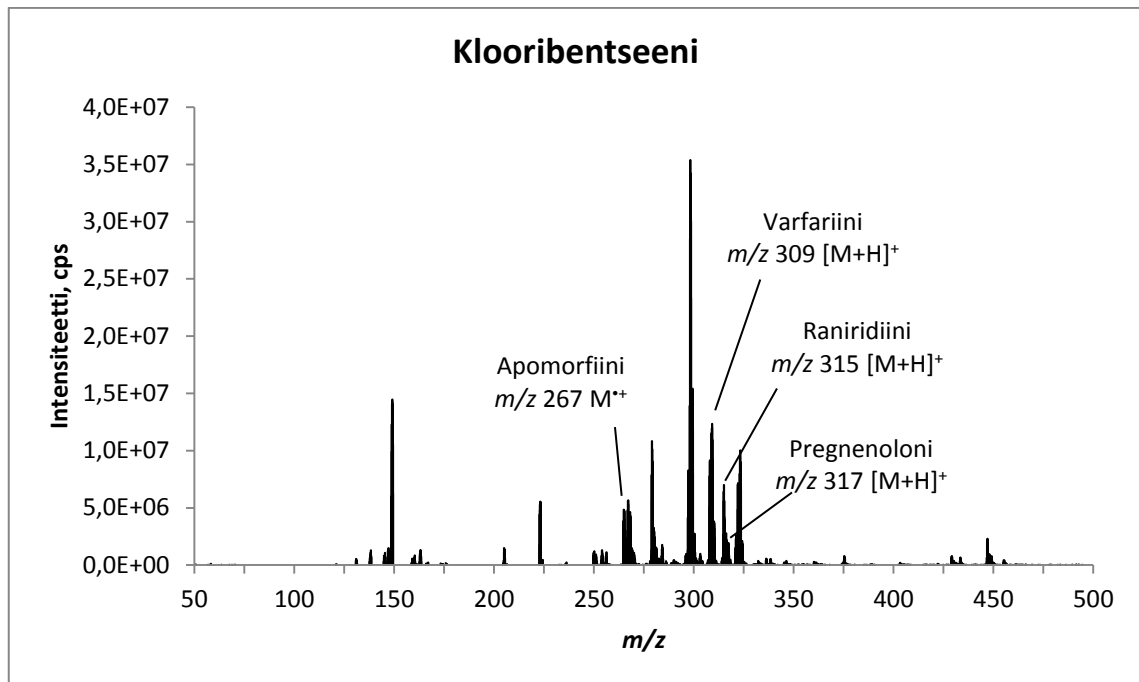
yhtä voimakkaasti. Klooribentseenillä ja anisolilla 0,5 % tolueenissa verapamiilin pilkeioni (m/z 303) näkyi voimakkaasti, kun taas asetonilla ja tolueenilla pilkeioni ei näkynyt ollenkaan (Kuvat 7a-d).

4.3.2 Asetonitriili-vesi

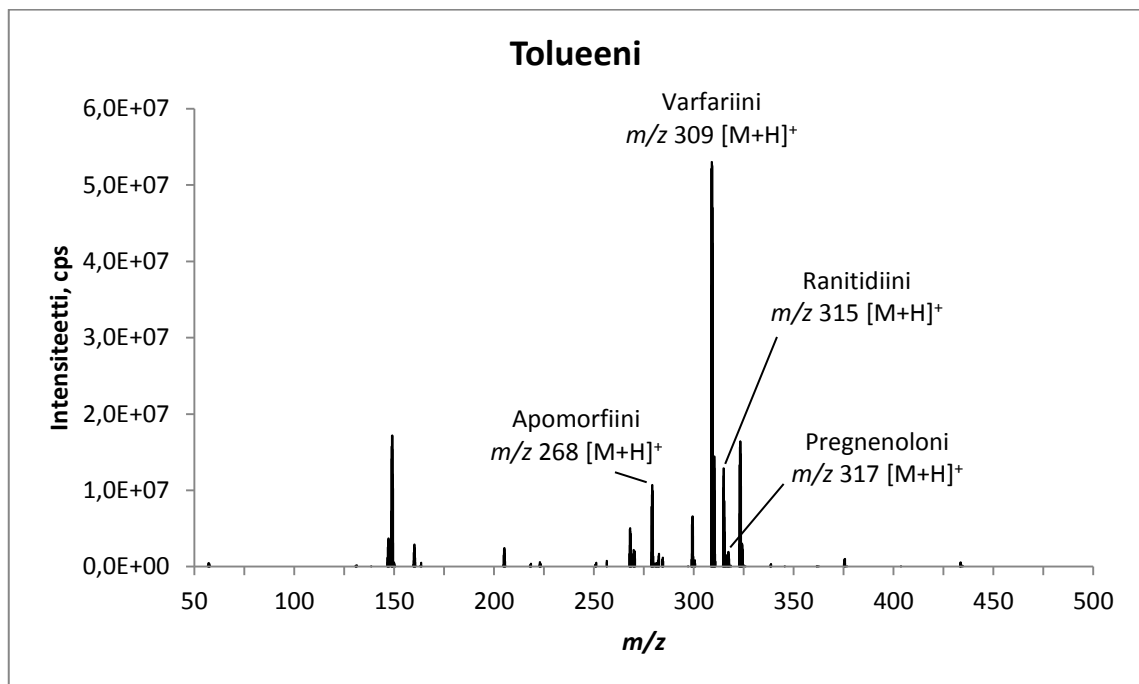
Seuraavaksi testattiin dopantteja asetonitriili-vesi liuotinseoksessa. Kaikista spektreistä on vähennetty tausta, joka oli mitattu pelkällä dopantilla samoissa ajo-olosuhteissa kuin näytteet. Spektreissä on summattuna 20 spektriä päällekkäin. Kuvissa 8a-d on esitetty spektrit näyteryhmästä 1 eri dopantteja käytettäessä.



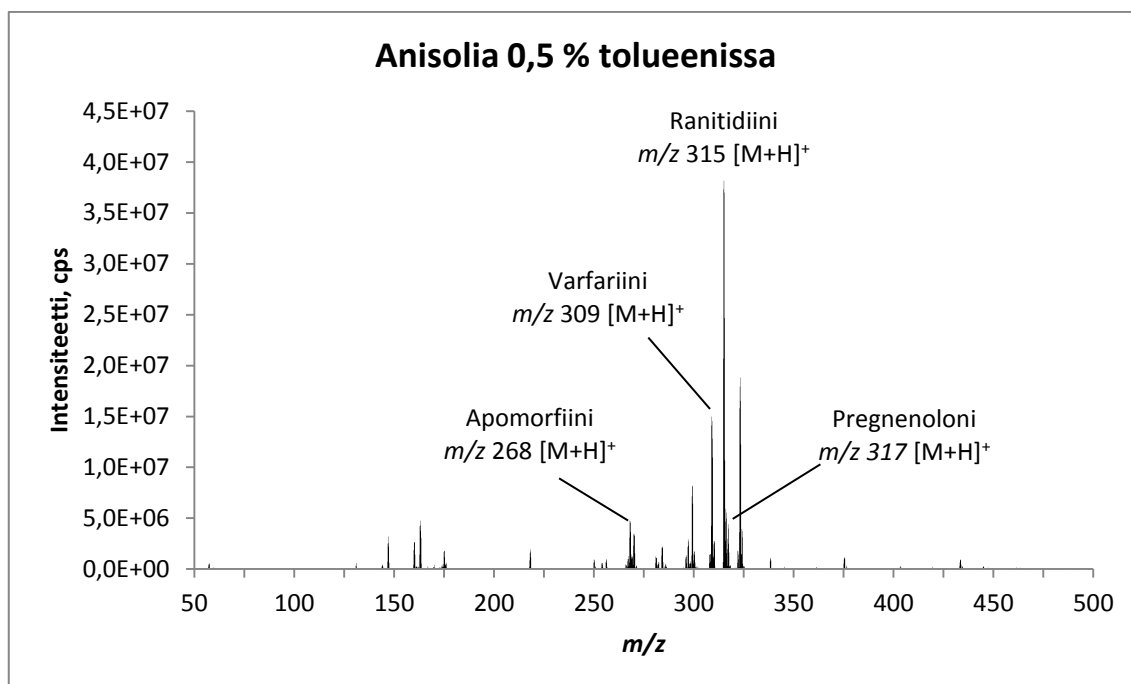
Kuva 8a: Näyteryhmän 1 spektri. Asetoni dopanttina, lasisiru.



Kuva 8b: Näyteryhmän 1 spektri. Klooribentseeni dopanttina, lasisiru.



Kuva 8c: Näyteryhmän 1 spektri. Tolueeni dopanttina, lasisiru.

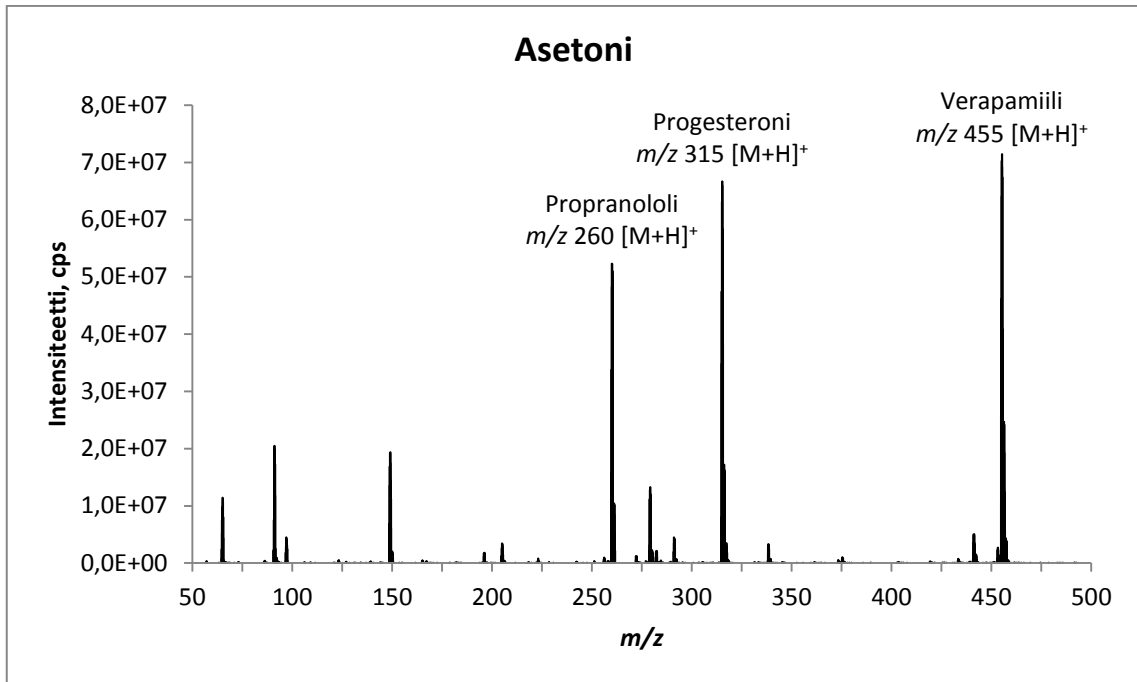


Kuva 8d: Näyteryhmän 1 spektri. Anisoli 0,5 % tolueenissa dopanttina, lasisiru.

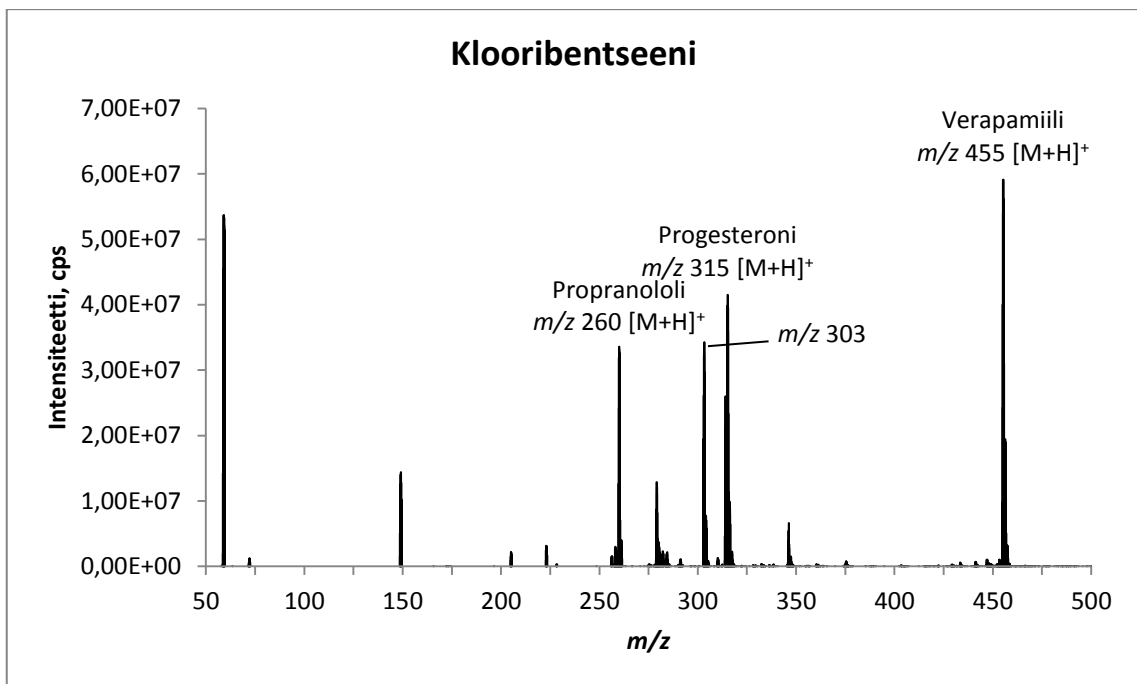
Asetoni, tolueeni ja anisoli 0,5 % tolueenissa muodostivat molekyyli-ionin $[M+H]^+$ jokaisesta analyytistä (Kuvat 8a, c ja d). Sen sijaan klooribentseeni muodosti apomorfiinista radikaalikationin (M^+) ja muista analyyteistä protonoituneen molekyylin $[M+H]^+$ (Kuva 8b).

Asetoni tuotti kaikista analyyteistä voimakkaimmat signaalit ACN:H₂O-seoksessa (Taulukko 8). Pregnenoloni ei tosin näkynyt asetonilla ACN:H₂O-seoksessa yhtä voimakkaasti kuin MeOH:H₂O-seoksessa parhaimman signaalin tuottanut tolueeni. Ranitidiini sen sijaan näkyi hieman voimakkaammin ACN:H₂O-seoksessa asetonia käytettäessä verrattuna MeOH:H₂O-seoksella parhaan ranitidiinin signaalin tuottaneeseen tolueeniin. Muilla analyyteillä signaalit eivät ole yhtä voimakkaita kuin MeOH:H₂O-seoksessa tolueenilla. Kefaleksiini ei edelleenkään tuottanut näkyvää signaalia millään dopantilla.

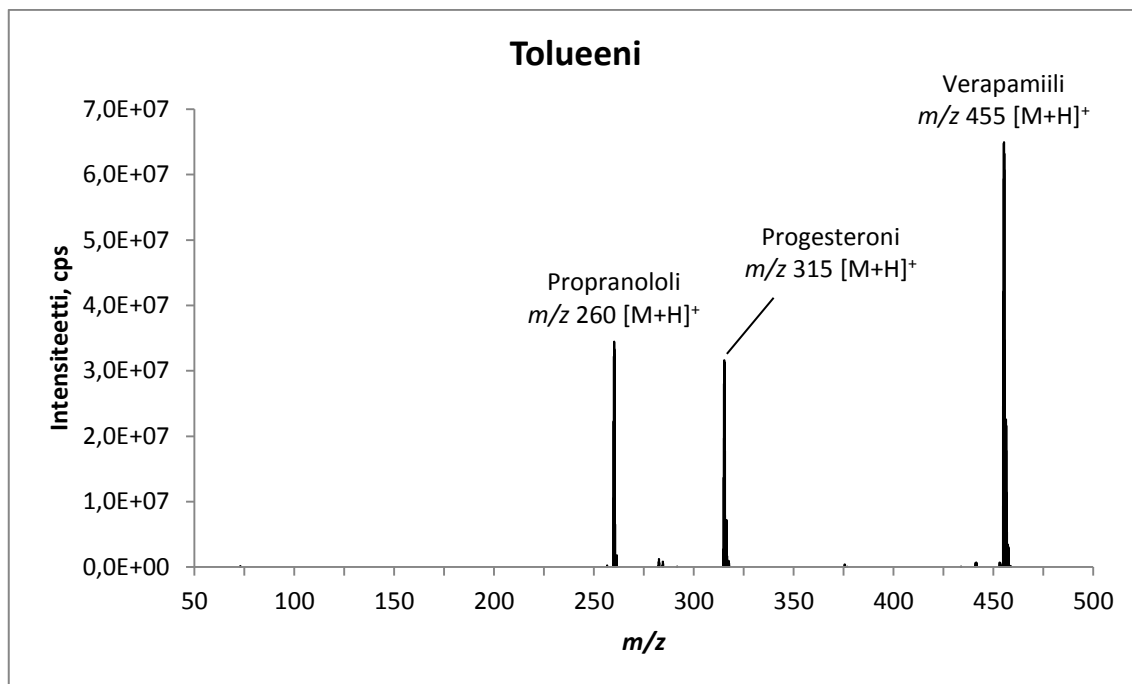
Kuvissa 9a-d on esitetty näyteryhmän 2 spektrit eri dopantteja käytettäessä.



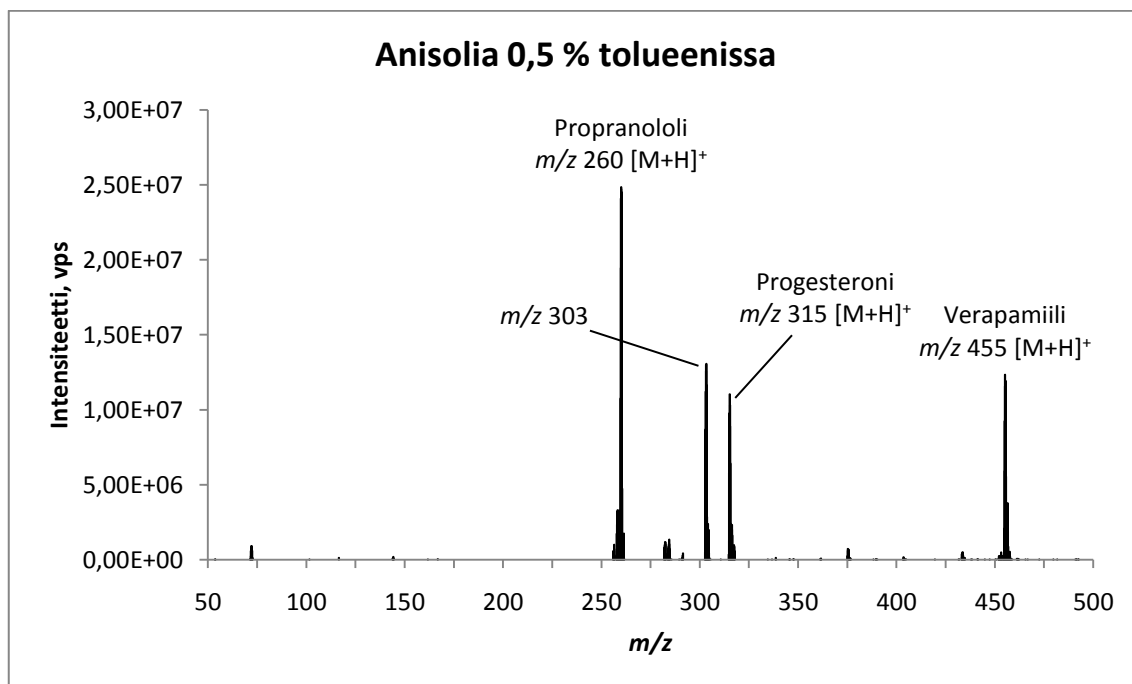
Kuva 9a: Näytteryhmän 2 spektri. Asetoni dopanttina, lasisiru.



Kuva 9b: Näytteryhmän 2 spektri. Klooribentseeni dopanttina, lasisiru.



Kuva 9c: Näyteryhmän 2 spektri. Toluene dopanttina, lasisiru.



Kuva 9d: Näyteryhmän 2 spektri. Anisolia 0,5 % tolueenissa dopanttina, lasisiru.

Asetoni tuotti myös progesteronista, propranololista sekä verapamiilista voimakkaimmat signaalit (Kuvat 9a-d, Taulukko 8) ACN:H₂O-seoksella. Verapamiili näkyi tosin lähes yhtä voimakkaasti asetonissa, tolueenissa ja klooribentseenissä. Propranololilla signaalien intensiteettien ero oli selkeämpi asetonin hyväksi.

Klooribentseeni ja anisoli 0,5 % tolueenissa tuottivat verapamiilista pilkeionin (m/z 303) samalla tavalla kuin metanoli-vesi-seoksen kanssa (Kuvat 9 b ja d).

Tulevia capLC-ajoja varten arvioitiin, millä dopantilla saadaan parhaat intensiteetit jokaiselle analyytille. Klooribentseeni ja anisoli 0,5 % tolueenissa tuottivat enemmän pilkeioneja kuin asetoni ja tolueeni, mutta toisaalta klooribentseenillä ja anisolilla 0,5 % tolueenissa kaikki analyytit eivät näkyneet yhtä hyvin kuin asetonilla ja tolueenilla. Taulukko 8 esittää analyyttien ionisoitumisen suhteellisen voimakkuuden eri dopanteilla eri ajoliuoksissa.

Taulukosta 8 huomataan, että parhaiten yhdisteet ionisoituivat asetonin ja tolueenin kanssa. CapLC-tutkimuksia varten dopantin valinnassa kiinnitettiin siis huomiota siihen, kuinka hyvin keskimäärin eri yhdisteet ionisoituivat ja kumman liuosseoksen kanssa. Kefaleksiini ei näkynyt kummallakaan liuotinseoksella missään dopantissa. Pregnenolonin ionisoituminen oli selvästi voimakkaampaa metanoli-vesi-liuotinseoksella kuin asetonitriili-vesi-seoksella. Muut analyytit näkyivät vähintään hyvin kummallakin liuottimella ainakin yhdellä dopantilla. Näin ollen dopantin valinta capLC-tutkimuksia varten painottui erityisesti pregnenolonin ionisoitumiseen, koska pregnenoloni ionisoitui vain muutamalla liuotinseos-dopantti-yhdistelmällä. Valinta piti tehdä siis tolueenin ja anisolin 0,5 % tolueenissa välillä. Pregnenolonista saatiin tolueenilla voimakkaampi signaali kuin anisolilla 0,5 % tolueenissa metanoli-vesi-seoksessa. Myös muut analyytit ionisoituivat keskimäärin voimakkaammin tolueenilla. Näin ollen capLC-tutkimuksia varten dopantiksi valittiin tolueeni.

Taulukko 8: Analyyttien ionisoituminen eri ajoliuottimissa ja dopanteissa. +++ = näkyy erittäin intensiivisenä (cps > $1,0 \times 10^8$), ++ = näkyy intensiivisenä (cps $5,0 \times 10^7$ – $1,0 \times 10^8$), + = näkyy hyvin (cps $1,0 \times 10^7$ – $5,0 \times 10^7$), - = näkyy heikosti tai ei ollenkaan (cps < $1,0 \times 10^7$).

	Asetoni	Klooribentseeni	Tolueeni	Tolueeni + 0,5 % anisoli
Apomorfiini (MeOH)	-	+	+++	++
Kefaleksiini (MeOH)	-	-	-	-
Pregnenoloni (MeOH)	-	-	++	+
Progesteroni (MeOH)	+	+	+	++
Propranololi (MeOH)	+	+	+	+
Ranitidiini (MeOH)	+	+	++	++
Varfariini (MeOH)	-	+	+++	+
Verapamiili (MeOH)	+	+	+	++
Apomorfiini (ACN)	++	-	-	-
Kefaleksiini (ACN)	-	-	-	-
Pregnenoloni (ACN)	-	-	-	-
Progesteroni (ACN)	++	+	+	+
Propranololi (ACN)	++	+	+	+
Ranitidiini (ACN)	+++	-	+	+
Varfariini (ACN)	+++	+	++	+
Verapamiili (ACN)	++	++	++	+

4.4 Kapillaarinestekromatografia

Erikoistyössä oli tarkoitus tutkia erityisesti teräsputken ominaisuuksia capLC:n kanssa, mutta capLC:n ja kolonnien kanssa oli suuria teknisiä ongelmia. Yhdisteiden erottumista yritettiin parantaa erilaisilla gradientteilla ja isokraattisilla ajoilla, erilaisilla kolonneilla ja laitteiston huollon kautta, mutta mikään em. toimenpiteistä ei saanut capLC:tä toimimaan kunnolla. Todennäköisesti vika löytyi nimenomaan capLC:stä, koska höyrystimien kanssa testattiin useita eri kolonneja ja eri ajoliuoksia, mutta mikään niistä ei toiminut.

Tulevaisuudessa teräsputkea olisi mielenkiintoista tutkia capLC:n kanssa ja verrata kuinka hyvin se suoriutuu verrattuna lasisiruun. Teräsputkihöyrystin voisi olla hyvä työkalu miniatyrisoiduissa systeemeissä, kunhan sen suorituskyvystä saadaan ensin kunnollista tutkimusnäyttöä.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Teräsputki tuotti voimakkaampia signaaleja kuin lasisiru eri ajo-olosuhteissa suurimmalla osalla analyysiajoista (Taulukko 7). Näin ollen teräsputki pystyy todennäköisesti ionisoimaan analyyttejä tehokkaammin kuin aikaisempi lasisiru. Teräsputki myös toimi yhtä hyvin kaikkien käytössä olleiden dopanttien kanssa toisin kuin lasisiru, jolla havaittiin lievä suorituskyvyn lasku, kun dopanttina oli anisoli 0,5 % tolueenissa.

Teräsputkea pitää lämmittää huomattavasti suuremmalla teholla kuin lasisirua, jotta sillä saavutettaisiin yhtä korkeita lämpötiloja kuin lasisirulla saavutettaisiin pienemmillä tehoilla (Kuva 5). Tämä voi olla ongelma analysoitaessa sellaisia yhdisteitä, joilla on korkea kiehumispiste. Seuraavaa höyrystimen kehitysversiota suunnitellessa tähän asiaan voisi kiinnittää huomiota, jotta ulosvirtaussuihku saataisiin lämpiämään tarpeeksi tehokkaasti. Vastuslangan käyttö lämmittämässä on kestävämpi ratkaisu kuin lasisirun platinainen lämmitinosa, joka hajoaa suhteellisen herkästi. Vastuslanka jää kuitenkin

tehokkuudeltaan liian heikoksi, joten toisenlainen lämmitysmekanismi olisi tarpeellista kehittää.

Teräsputki tuottaa yhtä vahvat signaalit pienemmällä näytteen ja sumutinkaasun virtausnopeuksilla kuin lasisiru, ja näin ollen säästää liuotin- ja näytteen kulutuksessa. Toisaalta teräsputkea joutuu lämmittämään suuremmalla teholla, jotta sillä päästään korkeampiin lämpötiloihin, mikä puolestaan kuluttaa sähköä. Höyrystimen uuden kehitysversion avulla tästä pienestä ongelmasta voisi päästä ainakin osittain eroon.

Teräsputken ominaisuuksia capLC:n kanssa ei pystytty tässä erikoistytössä tutkimaan. Koska vaikeuksia kohdattiin yhtä lailla myös lasisirun kanssa, vika todennäköisesti löytyy jostakin muualta kuin itse höyrystimestä. Näin ollen teräsputki voi hyvinkin olla käyttökelpoinen capLC:n kanssa. Asia vaatii kuitenkin lisätutkimuksia.

Vastaavalla tavalla kuin lasisirua on tutkittu, myös teräsputkea olisi mielenkiintoista tutkia myös GC:n ja muiden API-ionisaatiotekniikoiden kanssa (ESI, APCI, SSI TSI, DAPPI). μ APPI:n kanssa teräsputki käyttäytyi lupaavasti, ja voisi olettaa teräsputken pärjäävän myös muiden ionisaatiomenetelmien kanssa vähintään yhtä hyvin kuin lasisiru.

Dopanttien vertailusta tolueeni toimi parhaiten MeOH:H₂O-liuotinseoksen kanssa, kun taas asetoni toimi parhaiten ACN:H₂O-liuotinseoksen kanssa. Myös klooribentseeni tuotti kohtuullisen vahvoja signaaleja, ja lisäksi se tuotti analyyteistä enemmän pilkeioneja anisolin 0,5 % tolueenissa tapaan. Näin ollen klooribentseenillä ja anisolilla 0,5 % tolueenissa voisi olla käyttöä yhdisteiden tunnistamisessa, jossa on hyödyllistä rikkoa analyyttejä tunnistettaviin fragmentteihin.

KIRJALLISUUSLUETTELO

Ahonen L, Haapala M, Saarela V, Franssila S, Kotiaho T, Kostiainen R: Feasibility of capillary liquid chromatography/microchip atmospheric pressure photoionization mass spectrometry in analyzing anabolic steroids in urine samples. *Rapid Commun Mass Sp* 24: 958-964, 2010

Auroux P, Iossifidis D, Reyes DR, Manz A: Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Anal Chem* 74: 2637, 2002

Blakley CR, Carmody JJ, Vestal ML: A new soft ionization technique for mass spectrometry of complex molecules. *J Am Chem Soc* 102: 5931, 1980

Blakley CR, Vestal ML: Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 55: 750, 1983

Cai YX, Kingery D, McConnell O, Bach A: Advantages of atmospheric pressure photoionization mass spectrometry in support of drug discovery. *Rapid Commun Mass Sp* 19: 1717-1724, 2005

Driscoll JN, Clarici JB: A new photoionization detector for gas chromatography | Ein neuer Photoionisationsdetektor für die Gas-Chromatographie. *Chromatographia* 9: 567, 1976

Driscoll JN, Spaziani FF: PID development gives new performance levels. *Res Dev* 27: 50, 1976

Franssila S, Marttila S, Kolari K, Östman P, Kotiaho T, Kostiainen R, Lehtiniemi R, Fager C-, Manninen J: A microfabricated nebulizer for liquid vaporization in chemical analysis. *J Microelectromech S* 15: 1251, 2006

Haapala M: Heated nebulizer microchips for mass spectrometry. 2010

Haapala M, Luosujärvi L, Saarela V, Kotiaho T, Ketola RA, Franssila S, Kostiainen R: Microchip for combining gas chromatography or capillary liquid chromatography with atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *Anal Chem* 79: 4994-4999, 2007a

Haapala M, Pól J, Saarela V, Arvola V, Kotiaho T, Ketola RA, Franssila S, Kauppila TJ, Kostiainen R: Desorption atmospheric pressure photoionization. *Anal Chem* 79: 7867-7872, 2007b

Haapala M, Purcell J, Saarela V, Franssila S, Rodgers R, Hendrickson C, Kotiaho T, Marshall A, Kostiainen R: Microchip atmospheric pressure photoionization for analysis of petroleum by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem* 81: 2799-2803, 2009

Haapala M, Saarela V, Pól J, Kolari K, Kotiaho T, Franssila S, Kostiainen R: Integrated liquid chromatography–heated nebulizer microchip for mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 662: 163-169, 2010

Harrison DJ, Manz A, Fan Z, Lüdi H, Widmer HM: Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Anal Chem* 64: 1926, 1992

Hintikka L, Haapala M, Kuuranne T, Leinonen A, Kostiainen R: Analysis of anabolic steroids in urine by gas chromatography-microchip atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry with chlorobenzene as dopant. *J Chromatogr A* 1312: 111, 2013

Hintikka L, Haapala M, Franssila S, Kuuranne T, Leinonen A, Kostiainen R: Feasibility of gas chromatography–microchip atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry in analysis of anabolic steroids. *J Chromatogr A* 1217: 8290-8297, 2010

Hirabayashi A, Sakairi M: Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 66: 4557, 1994

Huikko K, Kostiainen R, Kotiaho T: Introduction to micro-analytical systems: bioanalytical and pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci* 20: 149-171, 2003

Kauppila TJ: Atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. 2004

Kauppila TJ, Kostiainen R, Bruins AP: Anisole, a new dopant for atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of low proton affinity, low ionization energy compounds. *Rapid Commun Mass Sp* 18: 808-815, 2004a

Kauppila TJ, Kuuranne T, Meurer E, Eberlin M, Kotiaho T, Kostiainen R: Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Ionization mechanism and the effect of solvent on the ionization of naphthalenes. *Anal Chem* 74: 5470, 2002

Kauppila TJ, Östman P, Marttila S, Ketola RA, Kotiaho T, Franssila S, Kostiainen R: Atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry with a microchip heated nebulizer. *Anal Chem* 76: 6797-6801, 2004b

Keski-Rähkonen P, Haapala M, Saarela V, Franssila S, Kotiaho T, Kostiainen R, Auriola S: Atmospheric pressure thermospray ionization using a heated microchip nebulizer. *Rapid Commun Mass Sp* 23: 3313-3322, 2009

Ketkar SN, Dulak JG, Dheandhanoo S, Fite WL: Benzene charge exchange at atmospheric pressure for low-level detection of pollutants in ambient air. *Anal Chim Acta* 245: 267, 1991

Khandurina J, Guttman A: Bioanalysis in microfluidic devices. *J Chromatogr A* 943: 159-183, 2002

Kruve A, Haapala M, Saarela V, Franssila S, Kostiaainen R, Kotiaho T, Ketola R: Feasibility of capillary liquid chromatography–microchip-atmospheric pressure photoionization–mass spectrometry for pesticide analysis in tomato. *Anal Chim Acta* 696: 77-83, 2011

Langhorst M: Photoionization detector sensitivity of organic compounds. *J Chromatogr Sci* 19: 98, 1981

Luosujärvi L, Haapala M, Thevis M, Saarela V, Franssila S, Ketola R, Kostiaainen R, Kotiaho T: Analysis of selective androgen receptor modulators by gas chromatography-microchip atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Sp* 21: 310-316, 2010

Luosujärvi L, Karikko M, Haapala M, Saarela V, Huhtala S, Franssila S, Kostiaainen R, Kotiaho T, Kauppila TJ: Gas chromatography/mass spectrometry of polychlorinated biphenyls using atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization microchips. *Rapid Commun Mass Sp* 22: 425-431, 2008

Manz A, Graber N, Widmer H: Miniaturized total chemical-analysis systems - a novel concept for chemical sensing. *Sensor Actuat B-Chem* 1: 244-248, 1990

Manz A, Harrison D, Verpoorte E, Fettingen J, Paulus A, Lüdi H, Widmer H: Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems - capillary electrophoresis on a chip. *J Chromatogr A* 593: 253-258, 1992

Mol R: On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry using dopant-assisted atmospheric pressure photoionization: Setup and system performance. *Electrophoresis* 26: 146-154, 2005

Mol R, de Jong G, Somsen G: Atmospheric pressure photoionization for enhanced compatibility in on-line micellar electrokinetic chromatography - Mass spectrometry. *Anal Chem* 77: 5277-5282, 2005

National Institute of Standards and Technology: NIST Webbook. Haettu 01.02.2014 internetistä: <http://webbook.nist.gov/chemistry>

National Institute of Standards and Technology: NIST Webbook. Haettu 22.12.2013 internetistä: <http://webbook.nist.gov/chemistry>

Pól J, Kauppila TJ, Franssila S, Kotiaho T, Kostiaainen R: Ionspray microchip. *Rapid Commun Mass Sp* 24: 2584-2590, 2010

Pól J, Kauppila TJ, Haapala M, Saarela V, Franssila S, Ketola RA, Kotiaho T, Kostiaainen R: Microchip sonic spray ionization. *Anal Chem* 79: 3519-3523, 2007

Ramsey RS, Ramsey JM: Generating electrospray from microchip devices using electroosmotic pumping. *Anal Chem* 69: 1174, 1997

Revel'skii I, Yashin Y, Voznesenskii V, Kurochkin V, Kostyanovskii R: Mass spectrometry with photoionization of N-alkanes, alcohols, ketones, esters, and amines at atmospheric pressure. *Izv Akad Nauk SSSR Ser Khim* 35: 1806-1810, 1986

Robb DB, Covey TR, Bruins AP: Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography mass spectrometry. *Anal Chem* 72: 3653-3659, 2000

Saarela V, Haapala M, Kostiainen R, Kotiaho T, Franssila S: Glass microfabricated nebulizer chip for mass spectrometry. *Lab Chip* 7: 644-646, 2007

Sikanen T, Franssila S, Kauppila TJ, Kostiainen R, Kotiaho T, Ketola RA: Microchip technology in mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 29: 351-391, 2009

Smith D, Robb D, Blades M: Comparison of dopants for charge exchange ionization of nonpolar polycyclic aromatic hydrocarbons with reversed-phase LC-APPI-MS. *J Am Soc Mass Sp* 20: 73-79, 2009

Syage JA: A man-portable, photoionization time-of-flight mass spectrometer. *Field Anal Chem Tech* 4: 204-215, 2000

Syage J, Evans M, Hanold K: Photoionization mass spectrometry. *Am Lab* 32: 24-+, 2000

Takats Z, Nanita SC, Cooks RG, Schlosser G, Vekey K: Amino acid clusters formed by sonic spray ionization. *Anal Chem* 75: 1514, 2003

Terry SC, Jerman JH, Angell JB: A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE T Electron Dev* 26: 1880, 1979

Tubaro M, Marotta E, Seraglia R, Traldi P: Atmospheric pressure photoionization mechanisms. 2. The case of benzene and toluene. *Rapid Commun Mass Sp* 17: 2423-2429, 2003

Wilm M, Mann M: Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* 68: 1-8, 1996

Wilm MS, Mann M: Electrospray and Taylor-cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int J Mass Spectrom* 136: 167, 1994

Xue Q, Foret F, Dunayevskiy Y, Zavracky P, McGruer N, Karger B: Multichannel microchip electrospray mass spectrometry. *Anal Chem* 69: 426, 1997

Yamashita M, Fenn J: Electrospray ion-source - another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem* 88: 4451-4459, 1984

Yin H, Killeen K, Brennen R, Sobek D, Werlich M, Van De Goor T: Microfluidic chip for peptide analysis with an integrated HPLC column, sample enrichment column, and nanoelectrospray tip. *Anal Chem* 77: 527-533, 2005

Zeleny J: The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces. *Phys Rev* 3: 69, 1914

Östman P, Marttila S, Kotiaho T, Franssila S, Kostianen R: Microchip atmospheric pressure chemical ionization source for mass spectrometry. *Anal Chem* 76: 6659-6664, 2004